

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Evaluación de dos métodos de criopreservación de
embriones sobre las tasas de sobrevivencia in vitro y
preñez en llamas**

TESIS

**para optar el grado académico de Magíster en Producción y Reproducción
Animal**

AUTORA

Martha Elizabeth Vásquez Eslava

Lima-Perú

2008

*A mis Padres Martha y Wilfredo, por amarme tanto
y por haberme enseñado lo mas importante
en la vida, el amor y respeto a toda persona.*

*A ustedes hermanitos Liliana y Junior, pedacitos del cielo,
por ser una de mis mas grandes motivaciones para seguir
luchando y creciendo en la vida*

*A John, por su infinito amor, comprensión
y amistad. Por llenar mi vida de una indescriptible
felicidad y fortaleza.*

*A ti Lucia, mi Chiita, por haberme enseñado a amar,
porque tu amor me acompaña a donde voy.*

Agradecimientos

***A ti mi Dios, por amarme y por darme
tanto en la vida, gracias por estar a mi lado en
cada instante, por ser mi fortaleza y la luz que
guía mi camino.***

*Al Dr. Wilfredo Huanca y a la Dra Aída Cordero,
por su aprecio y amistad. Porque sus enseñanzas y
consejos, han contribuido a forjar mi desarrollo profesional
y a la ejecución del presente estudio.*

*Al Dr. Sergio Cueva por su incondicional apoyo,
por su constante preocupación, y por todo el valioso
tiempo dedicado en la realización de la tesis*

*Al Dr. Victor Leyva por ser un profesional integro,
un modelo a seguir, gracias por sus enseñanzas
brindadas durante mi etapa de formación profesional*

*Al Dr. Alfonso Chavera y a la Dra. Hermelinda Rivera
por ser los amigos, dispuestos a ayudar en todo momento,
por su estima y sabiduría brindada*

*A Alexei Santiani por su amistad, apoyo y consejos otorgados
constantemente y durante la ejecución del presente trabajo*

*A Carlitos Angulo por su valiosísimo apoyo y amistad, por
el asesoramiento brindado en la revisión del trabajo*

*A la Dra. Isabelle Donnay, por su gran disponibilidad de ayuda
a pesar de la distancia y porque sus recomendaciones fueron
un importante aporte para el estudio*

*Al Dr. Lenin Maturrano, por todo el apoyo otorgado
en el desarrollo de la tesis*

*Al Dr. Ampuero por su inmenso cariño
y gran amistad*

*A todos mis amigos por ser manifestación del amor de Dios en
mi vida, por brindarme de mil maneras su apoyo durante el
desarrollo de la tesis, muchas gracias Hilda, Miriam, Marco, Julia,
Charito, Mariluz, Claudita, Nadia, Doris, William, Señor Juanito
Hugo C., Irma, Lenin, Melina, Susan, Mario.*

*Al Proyecto de Camélidos Sudamericanos
INIA-Puno, CIP Quimsachata, por su contribución
y facilidades brindadas durante la ejecución de los
experimentos del estudio. Agradecimientos especiales
a los Doctores Teodosio Huanca, Mario Lino, Oscar
Cárdenas, Rómulo Sapana y al personal técnico.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONCYTEC), por brindarme el soporte financiero
durante los estudios de maestría y en la ejecución de la
presente tesis.*

*A la Unidad de Post grado de la Facultad de Medicina
Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San
Marcos, agradecimientos al Dr. Rosadio, Director
de la Unidad y a Srta. Jessica por la atención y el apoyo*

*Al proyecto PROCOM 2006 “Biotecnologías Reproductivas
en el mejoramiento genético de Camélidos. Fase II y al Sub
Proyecto Biotecnologías Reproductivas como herramientas
para el mejoramiento de alpacas y llamas” INCAGRO-UNMSM,
por la contribución financiera para el desarrollo del presente estudio.*

ÍNDICE

Índice.....	i
Lista de Cuadros.....	iii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Anexos.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
 I. INTRODUCCIÓN.....	 1
 II. Revisión de Literatura.....	 2
2.1 Control neuroendocrino del ciclo reproductivo en Camélidos Sudamericanos.....	3
2.2 Dinámica folicular en Camélidos Sudamericanos.....	5
2.3 Ovulación en Camélidos Sudamericanos.....	7
2.4 Cuerpo Lúteo.....	9
2.5 Gametogénesis.....	10
2.5.1 Oogénesis.....	10
2.5.1.1 Formación de la zona pelúcida del óvulo durante su crecimiento.....	12
2.5.2 Espermatogénesis.....	13
2.5.2.1 Control de la meiosis.....	14
2.5.2.2 Control endocrino de la espermatogénesis.....	15
2.6 Fecundación e Implantación.....	15
2.6.1 Unión especie-específica del espermatozoide a la ZP.....	16
2.6.2 Inducción a la reacción del acrosoma por la ZP del óvulo.....	16
2.6.3 Fecundación y desarrollo temprano.....	17
2.7 Reconocimiento de la Preñez.....	18
2.7.1 Reconocimiento maternal de la preñez.....	18
2.7.2 Desarrollo embrionario temprano.....	20
2.7.2.1 Implantación.....	22
2.7.2.2 Elongación embrionaria.....	23
2.7.2.3 Migración celular del eje del cuerpo en el disco embrionario.....	23
2.7.2.4 Implantación en camélidos sudamericanos y dromedarios.....	24
2.7.3 Transcripts derivados maternos (ARN maternos).....	26
2.7.4 Regulación de progesterona durante el desarrollo embrionario temprano.....	28
2.7.5 Endocrinología y Bioquímica de la etapa embrionaria.....	28
2.7.6 Mortalidad embrionaria.....	31
2.7.6.1 Mortalidad embrionaria en Camélidos Sudamericanos.....	32
2.7.7 Gestación media, avanzada y parto.....	34
2.8 Métodos de Diagnóstico de Preñez en llamas y alpacas.....	35
2.8.1 Comportamiento sexual y niveles de progesterona.....	35
2.8.2 Palpación y baloteo.....	36
2.8.3 Diagnóstico de preñez por ultrasonografía.....	36
2.9 Sincronización y Superestimulación ovárica de Camélidos Sudamericanos.....	38
2.9.1 Sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular.....	38
2.9.2 Superestimulación ovárica.....	40

2.10 Colección y Transferencia de embriones.....	41
2.10.1 Morfología embrionaria.....	41
2.11 Criopreservación de embriones.....	41
2.11.1 Principio de la criobiología.....	42
2.11.2 Crioprotectores y soluciones para congelación.....	43
2.11.3 Métodos de criopreservación.....	44
2.11.3.1 Congelación lenta.....	45
2.11.3.2 Vitricación.....	48
2.11.3.3 Procedimientos para la criopreservación de embriones.....	49
2.11.4 Factores que determina la tolerancia embrionaria a la criopreservación.....	52
2.11.5 Determinación de la viabilidad.....	57
2.11.6 Dispositivos de almacenamiento.....	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.1 Lugar de estudio.....	58
3.2 Unidades experimentales.....	58
3.2.1 Animales.....	58
3.2.2 Embriones.....	59
3.3 Metodología experimental	59
3.3.1 Diseño experimental.....	59
3.3.2 Metodología.....	60
3.3.2.1 Selección y Superovulación de hembras donadoras.....	60
3.3.2.2 Recuperación, evaluación y clasificación de embriones.....	62
3.3.3 Criopreservación de embriones.....	62
3.3.4 Descongelación de embriones.....	63
3.3.5 Cultivo de embriones descongelados.....	64
3.3.6 Transferencia de embriones (evaluación <i>in Vivo</i>).....	64
3.3.7 Evaluación ecográfica.....	64
3.3.8 Reexpansión embrionaria (evaluación <i>in Vitro</i>).....	65
3.3.9 Tinción de embriones descongelados (evaluación <i>in Vitro</i>).....	65
3.4 Análisis estadístico.....	67
IV. RESULTADOS	
4.1 Características de embriones recuperados.....	68
4.2 Evaluación <i>in Vivo</i>	69
4.2.1 Diámetro y calidad embrionaria post descongelación.....	69
4.2.2 Tasa de preñez y tamaño del cuerpo lúteo de receptoras.....	69
4.3 Evaluación <i>in Vitro</i>	70
4.3.1 Características morfológicas embrionarias post descongelación.....	70
4.3.2 Calidad embrionaria post descongelación.....	71
4.3.3 Porcentaje de reexpansión embrionaria.....	72
4.3.4 Tinción de embriones descongelados.....	72
V. DISCUSIÓN.....	81
VI. CONCLUSIONES.....	94
VII. RECOMENDACIONES.....	95
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	96
IX. ANEXOS.....	124

LISTA DE CUADROS

Cuadro 01. Métodos de criopreservación de embriones.....	45
Cuadro 02. Diferencias en la resistencia a la criopreservación de oocitos y embriones dependiendo de la especie, estadio desarrollo y origen.....	57
Cuadro 03. Recuperación y distribución de embriones del estudio.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Diseño experimental.....	61
-------------------------------------	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 01. Calidad y diámetro de embriones recuperados según grupo experimental.....	68
Tabla 02. Calidad embrionaria antes y después de descongelación <i>in Vivo</i>	69
Tabla 03. Tasa de preñez de grupos experimentales.....	70
Tabla 04. Características morfológicas embrionarias post descongelación <i>in Vitro</i>	71
Tabla 05. Calidad embrionaria antes y después de descongelación <i>in Vitro</i>	71
Tabla 06. Características morfológicas embrionaria durante descongelación y tinción..... (Grupo Vitificado)	73
Tabla 07. Características morfológicas embrionaria durante descongelación y tinción..... (Grupo Congelado)	77

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01. Antecedentes reproductivos de hembras receptoras y donadoras.....	125
Anexo 02. Número de servicios realizado por los machos reproductores.....	126
Anexo 03. Características y distribución de embriones de los grupos experimentales.....	127

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos métodos de criopreservación sobre la sobrevivencia *in Vivo* e *in Vitro* de embriones de llama. Setenta y tres embriones en estadio de blastocisto eclosionado fueron recuperados no quirúrgicamente al día 6.5 después de la monta de llamas tratadas con 1000 UI de eCG, y fueron distribuidos aleatoriamente a cada uno de los 3 grupos experimentales: Control (n=14), Vitricación (n=30) y congelación lenta (n=29). Vitricación: Embriones fueron expuestos a la solución de vitricación (20 % Glicerol + 20 % Etilenglicol +0.5M Sucrosa + 10% Suero fetal bovino +50 ug/ ml Gentamicina) en dos pasos, y después de ser cargados en pajillas de 0.25 ml sumergidos en Nitrógeno líquido. Las pajillas fueron descongeladas en baño maría a 37 °C por 1 min y automáticamente mezclados con 0.5 M y 0.2 M sucrosa. Congelación lenta: Embriones fueron expuestos a PBS con 1.5 M de Etilenglicol + 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) + 50 ug/ml de gentamicina cargados en pajillas de 0.25 ml, sellados y enfriados durante 3 hrs dentro de un refrigerador, a una tasa de enfriamiento de 0,12 °C/min desde 26 °C hasta 5°C. Luego las pajillas fueron transferidas al tanque de nitrógeno, donde se continuó el descenso de temperatura a una tasa de 5°C /min, desde 5°C hasta -20°C, por 5 min, para finalmente ser sumergidos en nitrógeno líquido (N₂L). Después de la descongelación la remoción de los crioprotectores se realizó utilizando las soluciones de dilución Sucrosa 0.25M y 0.12M.. Todos los embriones del grupo control y el 50 % de ambos grupos criopreservados fueron evaluados *in Vivo* siendo transferidos directamente a hembras receptoras previamente sincronizadas; los embriones criopreservados fueron primero cultivados por 2 hrs. en PBS+ 20% SFB, en un horno a 35 °C. La tasa de preñez fue de 30.77 % (4/13), 16.67 % (2/12) y 0 % (0/11) para las receptoras que recibieron los embriones controles, vitricados, congelados respectivamente; diagnosticados entre los 20 y 30 días de preñez, mediante ultrasonografía transrectal; no observándose diferencia estadística significativa (p<0.05). Para la evaluación *in Vitro* los embriones criopreservados fueron cultivados en PBS + 20 % SFB, en una atmósfera compuesta por 5 % de CO₂, 20 % de O₂ y 75% de N₂, durante 1 hr. a 39 °C, para posteriormente registrar su morfología y reexpansión embrionaria. Se observó cambios morfológicos, disminuyendo la calidad en mayor proporción en los embriones que fueron congelados. Reexpandieron un 75 % (9/12) de embriones vitricados y un 57.14 % de embriones congelados lentamente (4/7), siendo esta diferencia no significativa (p<0.05). Se determinó que ambos métodos de criopreservación disminuyeron la calidad embrionaria post descongelación, siendo mayor en embriones congelados, determinada por las características morfológicas y por la aparición de cambios anormales en los embriones evaluados *in Vivo* e *in Vitro*. El grupo control no fue evaluado *in Vitro*. Los datos fueron analizados por las pruebas de Chi-cuadrado, Fisher exacta y ANOVA de una vía para la evaluación *in Vivo* y Fisher exacta y T- de Student para la evaluación *in Vitro*. Los resultados nos permiten concluir que la vitricación podría ser el método adecuado para criopreservar embriones de llama.

Palabras claves Llama, vitricación, congelación lenta, preñez, reexpansión.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of two cryopreservation methods on the llama embryo *in Vivo* and *in vitro* survival. Seventy three hatched blastocysts were collected non-surgically at day 6.5 after mating from llamas treated with 1000 IU eCG, and were randomly allocated to each one of three experimental groups: Control (n=14), Vitrification (n=30) and slow freezing (n=29). Vitricification: Embryos were exposed to vitrification solution (20 % glycerol (GLY) + 20% ethylene glycol (EG) + 0.5M sucrose + 10 % Fetal Calf Serum (FCS) + 50 µg/ ml gentamicin sulfate) in two steps, and after loading into 0.25 ml straws, were plunged into liquid nitrogen. Straws were thawed in a 37 °C waterbath for 1min and automatically mixed with 0.5 M and 0.2 M sucrose solutions. Slow freezing: Embryos were exposed to PBS 1.5 M EG + 10 % FCS + 50 µg/ ml gentamicin sulfate, loaded in 0,25 ml straws and cooled 3 hours inside refrigerator, at 0,13 °C/min cooling rate from 26 °C until 5°C. Then straws were transfer into nitrogen tank, where it was followed temperature decrease at 5°C /min, from 5°C until -20°C, for 5 min, finally were plunged into liquid nitrogen. After thawing cryoprotectant was removed using dilution solutions, 0.25 M and 0.12 M sucrose. All embryos from control group and 50% from both cryopreservation groups were evaluated *in Vivo*: they were directly transferred into previously synchronized recipients; but cryopreserved embryos were first cultured in PBS+ 20% FCS for 2 h in PBS+ 20% FCS, inside of oven at 35°C. Pregnancy rate was 30.77 % (4/13), 16.67 % (2/12) y 0 % (0/11) to recipients which received control, vitrified and freezing embryos, respectively; diagnosed between 20 and 30 days of pregnancy, by transrectal ultrasound, it was not observed significant statistic difference ($p<0.05$). *In Vitro* evaluation cryopreserved embryos were cultured in PBS + 20 % FCS under 5 % CO₂, 20 % O₂ , 75% N₂ at 39°C for 1 h., then morphology and reexpansion were recorded. Reexpansion of vitrified and freezing embryos was 75 % (9/12) and 57.14 % (4/7), respectively; which were not significantly different ($p<0.05$). It was observed that both cryopreservation methods decreased embryo quality post thawing, being higher in freezing embryos, by determining morphology characteristics and abnormal changes appearance on *in Vivo* and *in Vitro* evaluated embryos. Control group were not *In vitro* evaluated. Data were analyzed using Chi-square, Exact Fisher and one way-ANOVA to *in Vivo* evaluation and Exact Fisher and T-Student test to *in Vitro* evaluation, respectively. Results permit to conclude that vitrification could be the suitable method to llama embryo cryopreservation.

Key words: Llama, vitrification, slow freezing, pregnancy, reexpansion.

I. INTRODUCCIÓN

Los avances en la criobiología, la biología celular y la embriología de animales domésticos han hecho capaz el desarrollo de metodologías de preservación de embriones de varias especies domésticas (Dobrinsky, 2002), y recientemente también en llamas (Aller *et al.*, 2002; Palasz, *et al.*, 2000). La explotación de camélidos sudamericanos domésticos es una actividad de gran importancia social y económica para la población altoandina. La criopreservación, junto a la transferencia de embriones e inseminación artificial, es una de las técnicas que puede contribuir al incremento de la productividad de estas especies, ya que permite la preservación y transporte de germoplasma (Dobrinsky, 2002), por tanto, se incrementa la posibilidad de que cada hembra produzca un mayor número de crías a lo largo de su vida reproductiva.

En la actualidad existen dos métodos para la criopreservación de embriones. Entre ellos están el método convencional, que consiste en una congelación lenta y el método de vitrificación que consiste en un enfriamiento muy rápido. El método de vitrificación tiene ventajas sobre el método de congelación lenta, ya que es menos probable que ocurran daños relacionadas a la formación de cristales de hielo, además los embriones pueden ser criopreservados en menor tiempo, mediante un método que no necesita equipos sofisticados para el descenso de temperatura que si lo requiere la congelación lenta (El-Danasouri, 2001).

La vitrificación ha mostrado ser un método apropiado para la criopreservación de embriones, lográndose obtener crías vivas después de transferir embriones vitrificados de varias especies domésticas (Aller, *et al.*; 2002). Se ha reportado un 50% de preñez en oveja después de transferir embriones vitrificados (Papadopoulos *et al.*, 2002). Por otro lado, también se han reportado estudios criopreservando embriones de camélidos dromedarios (*Camelus dromedarios*), mediante el método de congelación lenta, con resultados menores hasta el momento (8% Nowshari *et al.*, 2005; 32 %: Skidmore *et a.* 2004).

Kaidi *et al.* (2001) compararon *in Vitro* el efecto de la congelación lenta y la vitrificación sobre la morfología y metabolismo del blastocisto bovino, y demostraron que disminuyó el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno en blastocistos producidos *in Vitro* y congelados lentamente, además de incrementarse su actividad glucolítica, indicando el estrés producto de este último proceso. Es así que Fair *et al.* (2001) reportaron que la morfología del embrión es afectada por la exposición a crioprotectores posterior a una congelación lenta.

La criopreservación puede causar significativas alteraciones morfológicas y bioquímicas, los que pueden producir muerte celular y pérdida de la viabilidad embrionaria. Los daños asociados a la criopreservación que puedan afectar al embrión y que puedan comprometer su futura viabilidad, dependen de varios factores como el tipo y concentración del crioprotector, protocolo de congelación, especie, estadio de desarrollo embrionario y tipo de producción del embrión (Rall *et al.*, 2000; Vajta, 2000; Hasler, 2001; Dobrinsky *et al.*, 2000).

La vitrificación, permite la conservación de tejidos y células sin formación de cristales de hielo, esto parece prometedor para resolver algunos de los problemas asociados con la criopreservación. Por ello la vitrificación podría ser una buena alternativa para criopreservar embriones de llamas. No obstante, se han realizado muy pocos estudios para determinar los efectos de la criopreservación sobre la futura viabilidad embrionaria. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la sobrevivencia embrionaria *in Vivo* e *in Vitro* de embriones de llama criopreservados mediante los métodos de vitrificación y congelación lenta.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Control Neuroendocrino del ciclo reproductivo en Camélidos Sudamericanos

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es el neuropéptido clave que controla la función reproductiva en todas las especies de vertebrados. En hembras de ovulación inducida (conejos, hurones, gatos y camélidos), la liberación preovulatoria de GnRH y el resultante surgimiento preovulatorio de LH, es inducido por el estímulo somatosensorial genital durante la monta (Bakker y Baum, 2000; Novoa y Leyva, 1996).

La GnRH es secretada por el área del cerebro llamado núcleo arcuato, ubicado en el hipotálamo medio basal. Su liberación está influenciada por neuronas ubicadas en otras regiones cuyas terminales nerviosas contactan con el núcleo arcuato. Éste recibe factores estimuladores como epinefrina y norepinefrina o factores inhibidores como dopamina, serotonina y opiodes endógenos (Birnbaumer *et al.*, 1985).

En especies de ovulación espontánea la liberación de GnRH es inducida por esteroides ováricos, los que estimulan la secreción pulsátil de GnRH hacia la eminencia media y este se traduce en un estímulo para la secreción preovulatoria de LH. Pero en hembras de especies de ovulación inducida el patrón de liberación de GnRH es diferente, ya que el estradiol actúa en el cerebro para inducir aspectos de comportamiento sexual de proreceptividad o receptividad y no directamente en la liberación de GnRH.

El mecanismo primario involucrado en la liberación preovulatoria de GnRH comprende la activación de neuronas noradrenérgicas del cerebro medio y del encéfalo en respuesta a las señales de las neuronas somatosensoriales, estas señales son generadas por la introducción del órgano copulatorio del macho durante la monta (Bakker y Baum, 2000).

Es importante el rol que juega el estradiol en ovuladores espontáneos en la función neuroendocrina, no obstante se ha reportado que las neuronas de GnRH no poseen receptores para esteroides (Bhat *et al.*, 1998); por tanto, estos últimos no podrían estimular la síntesis de GnRH directamente, sin la participación de neurotransmisores.

Las neuronas noradrenérgicas proyectan estímulo al hipotálamo medio basal y cuando éste está activado promueven la liberación de GnRH en terminales nerviosos de la eminencia media (Bakker y Baum, 2000), y es conducida a través del sistema hipotálamo-hipofisario hasta la hipófisis anterior (Arthur *et al.*; 1991; Hafez, 1996). Aquí la GnRH estimula la liberación de las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), las cuales regulan la esteroidogénesis y la maduración de gametos.

La FSH es una hormona esencial para el inicio del desarrollo y mantenimiento de los folículos ováricos en los mamíferos en presencia de LH estimula la secreción de estrógeno por los ovarios, LH estimula la producción de testosterona en la teca interna y FSH estimula la aromatización de testosterona a estrógeno en las células granulosas del folículo (Hafez, 1996).

El rol principal de la secreción de LH es la inducción de la ovulación después de la cual se produce la luteinización de las células del folículo ovulatorio y comienza la secreción de P_4 , la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo, al prevenir la secreción de GnRH y desensibilizar los gonadotrofos de la hipófisis a la acción de GnRH (Stevenson, 1997).

Otra sustancia que actúa como neurotransmisor en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis es el leptin (Zieba *et al.*, 2004), que es una proteína sintetizada en el tejido adiposo y secretada a la circulación (Barb *et al.*, 2004). Estudios realizados en ratas observaron que el leptin actúa a nivel de cuerpos y axones terminales de las neuronas (Watanobe, 2002)

Por su parte Barb *et al.* (2004) determinaron que las concentraciones de leptin en la circulación incrementaron en el curso del desarrollo puberal, y sus niveles en el suero

alcanzaron un umbral estimuladorio, el cual permitió la activación del eje hipotálamo-hipofisario. Esto último está asociado también a la disminución de la acción de retroalimentación negativa del estradiol y a la estimulación de la expresión del gen leptin en el adiposito.

En vaquillas esta expresión del gen leptin en la pubertad coincide con un aumento en las concentraciones de IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina) en suero y al incremento de peso corporal (García *et al.*, 2002). De la misma forma el IGF-I y la insulina parecen intervenir en el rol de unión entre el balance energético y la activación del eje reproductivo (Barb *et al.*, 2004).

2.2.- Dinámica folicular en Camélidos Sudamericanos

Las llamas, alpacas y vicuñas presentan un desarrollo folicular en forma de ondas (Bravo y Sumar 1989; Adams *et al.* 1990; Bravo *et al.*, 1990; Chaves *et al.* 2002; Vaughan *et al.*, 2004; Miragaya *et al.*, 2004), siendo este similar al reportado en otras especies, con una fase de reclutamiento determinado por el crecimiento de varios folículos primordiales, la posterior selección de un selecto grupo y finalmente la emergencia de un folículo dominante, con un diámetro ≥ 7 mm, según ha sido descrito en llamas y alpacas (Adams *et al.* 1990; Vaughan *et al.* 2004).

El folículo dominante tiene tres fases de desarrollo, crecimiento (incremento de diámetro folicular), estática (cambios mínimos en el diámetro) y regresión (disminuye su diámetro) (Stevenson, 1997). Cuando el folículo dominante sufre regresión, un grupo de folículos antrales son reclutados para la emergencia de la siguiente onda folicular (Ginther *et al.*, 1989). Es probable que en camélidos al igual como sucede en otras especies, la inhibina producida por el folículo dominante participe en la regresión de los folículos subordinados (Fortune, 1994), requiriendo también del efecto sinérgico del estradiol y de otros reguladores intraováricos, y menores niveles de FSH en el día de la desviación folicular (Ginther *et al.*, 1997).

Bravo *et al.* (1990) en un estudio con llamas obtuvieron un promedio de duración de $4,8 \pm 1,5$ días para el folículo dominante en crecimiento (3-8, -10 o -12 mm), para la fase estática o de madurez folicular (folículos de 8- 12 mm) promedió $5,0 \pm 1,6$ días, y en la regresión folicular (desarrollo final 3 mm) promedió $4,0 \pm 1,1$ días, abarcando en total 14 días aproximadamente.

En llamas, la actividad de crecimiento folicular ha sido muy bien documentada bajo tres diferentes condiciones fisiológicas: anovulatorio (sin monta), ovulatoria pero no gestante (monta con macho vasectomizado) y ovulatoria gestante (monta con macho fértil), reportándose intervalos entre ondas de 20-25 días en llamas no servidas, 19.8 ± 0.7 días en llamas servidas con machos vasectomizados y 14.8 ± 0.6 días en hembras gestantes (Adams *et al.* 1990).

En alpacas se reporta un intervalo entre ondas de 15 días (Bravo y Sumar, 1989), similar al establecido por Vaughan *et al.* (2004) quien señala un intervalo de ondas de 12 días en el 39 % y 16 días en el 32 % de animales evaluados por ecografía. Se ha determinado que en llamas, el desarrollo de un subsecuente folículo de una nueva onda folicular, usualmente comienza en 2-3 días después del inicio de la regresión del folículo dominante de la onda anterior (Bravo *et al.*, 1990).

La presencia de un folículo ≥ 7 mm, determina la conducta de receptividad de la hembra llama y alpaca al macho (Adams *et al.* 1990, Vaughan *et al.*, 2004), sugiriendo que la capacidad de ovular de alpacas y llamas ante un estímulo de la cópula, está determinado por el estadio de desarrollo folicular, crecimiento o estático, al momento de la monta (Cervantes *et al.*, 2007, Vaughan *et al.*, 2004, Bravo *et al.*, 1991); mientras que los estadios ováricos con folículos en regresión, si bien mantiene capacidad de ovulación, posiblemente van a producir ovocitos en estadios de maduración avanzados o con cambios cualitativos, que se manifiesta en una menor tasa de gestación (Cervantes *et al.*, 2007). Estas diferencias en los estadios de crecimiento folicular al momento de la cópula podrían explicar algunos de los factores involucrados en la mortalidad embrionaria de alpacas y llamas.

Adams y Ratto (2001) reportaron que el diámetro máximo del folículo dominante anovulatorio fue más grande en llamas no preñadas (que no ovularon = 12.1 ± 0.4 mm; que ovularon = 11.5 ± 0.2 mm) que en llamas preñadas (9.7 ± 0.2 mm). Además, la lactación fue asociada con un diámetro máximo de folículo dominante mas pequeño durante todos los estados reproductivos (10.4 ± 0.2 mm) y con la disminución en el número de folículos (12).

Es por esta razón que la lactación y la presencia de un cuerpo lúteo están asociadas a la depresión del desarrollo folicular (Adams *et al.*, 1990). El conocimiento en detalle de las ondas foliculares ováricas, puede ser utilizado para optimizar el tiempo de monta, lo cual conllevaría a buenos porcentajes de fertilidad y el desarrollo de protocolos que faciliten el control del estado folicular ovárico en camélidos sudamericanos.

2.3.- Ovulación en Camélidos Sudamericanos

Los camélidos, como especies de ovulación inducida, requieren del estímulo de la cópula para ovular (San Martín, *et al.* 1968). Sin embargo, las hormonas (Novoa, 1991) y factores apropiados como los físicos, auditivos, olfatorios o visuales, también pueden provocar la ovulación. Además, según ha sido determinada recientemente, un factor inductor de ovulación (FIO) presente en el plasma seminal de estas especies puede inducir la ovulación (Adams *et al.*, 2005). En camélidos sudamericanos, es la estimulación producida por el coito y no el incremento de estrógenos, la que inicia el proceso de descarga de LH (Novoa y Leyva, 1996). Es así que las concentraciones de estradiol no varían durante las 18 horas posteriores a la cópula, tienden a declinar a las 22 horas y son significativamente menores alrededor de las 48 horas después de la cópula (Bravo, 1997).

La elevación de los perfiles de estradiol en las hembras con folículos mayores a los 7 mm no parece ser suficiente, por sí sola, para estimular la descarga pre ovulatoria de Hormona Luteinizante (LH) como ocurre en las especies de ovulación espontánea, por lo que requiere de estímulos adicionales como el FIO. Por otro lado la LH permanece elevada en llamas ($2,6 \pm 0,6$ ug/L) inmediatamente después de la monta (Aba *et al.*, 1995); al igual que las concentraciones de prostaglandina en llamas (709 ± 60 pmol /L) y en alpacas (30 pmol /L). El pico de surgimiento preovulatorio de LH se observó a las 2 horas; hallándose valores basales 7 horas post-cópula (Milligan, 1982).

La monta es el estímulo natural más efectivo que induce la ovulación en camélidos sudamericanos. No obstante, la monta sin penetración penil resulta en bajos porcentajes de ovulación. (Fernández Baca, 1993). Es así que Sumar (1993) reportó una respuesta ovulatoria baja (15%) en alpacas montadas por otras hembras y por un macho llevando un delantal para prevenir la intromisión del pene. Por el contrario, el servicio con introducción del pene de machos vasectomizados o enteros, elevó significativamente la tasa de ovulación en 77 % y 82%, respectivamente. Este 20- 30 % de hembras que no llegaron a ovular podría estar relacionado a la falta de descarga ovulatoria de LH en respuesta al coito (Fernández Baca, 1993).

El incremento en el número de servicios a tres servicios en un período de 24 horas no afectó el rango de ovulación. De la misma forma Bravo (1997) no detectó una segunda liberación de LH, después de una segunda cópula 24 horas después de la primera.

Estudios realizados con la ayuda de la ultrasonografía señalan que la ovulación, independiente del estímulo, ocurre en promedio alrededor de las 30 horas en llamas (Huanca *et al.*, 2001, Ratto *et al.*, 2006); mientras que en alpacas, experiencias recientes sugieren que en promedio la ovulación parece ocurrir entre 3 a 4 horas antes que en llamas (Sumar J, 2008 comunicación personal). Similar a lo observado anteriormente por Novoa y Leyva (1996), quienes reportaron una ocurrencia de ovulación en alpacas a las 26 horas post-coito.

La tasa de ovulación es similar entre ambos ovarios, aún cuando un alto porcentaje de gestaciones se encuentren en el lado izquierdo (Fernández- Baca *et al.*, 1970a; Bravo y Varela, 1993), un estudio reciente sugiere que los ovocitos procedentes del ovario derecho podrían tener una mayor probabilidad de sobrevivencia embrionaria que los procedentes del ovario izquierdo, posiblemente por la necesidad de migrar hacia el cuerno izquierdo (Cervantes *et al.*, 2006).

Se ha reportado la presencia de un 5 – 10 % de ovulaciones espontáneas atribuido a los estímulos físicos, auditivos o visuales (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Bravo y Sumar 1989). Mientras que la frecuencia de fallas a la ovulación se da en un 10 a 30% (Bravo *et al.*, 1991), y las ovulaciones múltiples suceden en un 10% de animales (Fernández Baca *et al.*, 1970a).

El factor inductor de ovulación (FIO) del plasma seminal produjo un 100 % de ovulación en alpacas y llamas (López, 2004), similar a lo reportado en camellos bactrianos (*Camelus bactrianus*) vía intramuscular; sin embargo, los pesos moleculares que provocaron la ovulación fueron de ≥ 30 kDa (Vásquez, 2005) y 19.4 kDa (Pan *et al.*, 2001), para llamas y camellos, respectivamente. Estos elevados pesos moleculares sugieren una naturaleza protéica del FIO, la cual ha sido comprobada en camellos bactrianos (Pan *et al.*, 2001), pero aún no el camélidos sudamericanos.

El transporte del plasma seminal conteniendo el FIO, se ha sugerido que es a través de las paredes del endometrio uterino y vía sanguínea hasta los centros hipotalámicos y/o hipofisarios (Ratto *et al.*, 2005), ayudado por factores como una copula intracornual, largo período de cópula y el consiguiente proceso inflamatorio del endometrio uterino, lo que determina que al final de la cópula se observe, en una alta proporción, una secreción sanguinolenta en las hembras servidas (Bravo W. 1997).

Una vez que los estímulos copulatorios, mediante un reflejo neuroendocrino, o el FIO llegan a los centros hipotalámicos e hipofisarios, se produce un primer incremento en los perfiles de la Hormona LH entre los 15 a 40 minutos después de iniciada la copula, llegando a

los niveles mas elevados entre las 2 o 3 horas después de la monta, retornando a niveles basales entre las 7 a 72 horas (Aba *et al.*, 1995; Aba *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 1993).

2.4.- Cuerpo Lúteo

Después de la ovulación comienza la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa. Posteriormente el tejido de este cuerpo lúteo (CL) se agrandan principalmente por hipertrofia de las células luteínicas (Hafez, 1996). El CL es claramente detectado alrededor del día 3-4 después de la monta en alpacas, y a los 4-5 días post – monta en llamas, utilizando ultrasonografía (Fernández Baca *et al.*, 1970 c; Adams *et al.*, 1991)

El CL alcanza un diámetro máximo (12 – 14 mm) al día 8-9 post monta en animales no preñados, pero de aquí en adelante ocurre un declive marcado en el tamaño de éste (Adams *et al.*, 1991). Por estos días se detectó también concentraciones sanguíneas de progesterona de 10 a 20 nmol / L, sugiriendose una relación positiva entre el peso del CL, el diámetro de éste, y las concentraciones sistémicas de progesterona (Bravo, 1997).

Los niveles de prostaglandina F2 α (PGF2 α) empieza a elevarse (Sumar *et al.*, 1988), principalmente entre los días 9 y 12 (805 ± 131 pmol / L) (Aba *et al.*, 1995). Este último evento se debe al efecto luteolítico de la PGF2 α , liberado desde el útero; y aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual ejerce su acción; Leyva y García (1999 c) la sugieren como agente luteolítico en camélidos, ya que encontraron que prostaglandina exógena afecta la vida del CL al administrarla después del día 4 de la fase luteal inducida; por otro lado, la progesterona exógena reduce la vida del CL pero cuando se administra tempranamente en esta misma fase y este efecto disminuye conforme incrementa la edad del CL (Leyva y García , 1999b). Gracias a diferentes estudios realizados se ha sugerido que existe una relación positiva entre el peso del CL, el diámetro de éste, y las concentraciones sistémicas de progesterona (Bravo, 1997).

En alpacas, cinco días post ovulación desaparece la conducta de receptividad del macho, continuando así hasta que el CL regrese en caso de monta infértil (Fernández Baca, 1971). Pero en los primeros días posteriores a la ovulación en los cuales aún hay presencia de receptividad sexual, se sugiere sean debidos a que los niveles de progesterona secretados por el CL son todavía insuficientes para ejercer el efecto inhibitorio sobre el eje hipotalámico-hipofisario (Leyva y García, 1999 a). Si no se produce la fertilización, el CL involucre a partir del día 13 post ovulación, retornando la receptividad al macho (Fernández Baca, 1971)

En el caso de llamas preñadas Adams *et al.* (1991) encontraron un descenso en los niveles séricos de progesterona entre los días 8 – 10 post monta, esta caída momentánea representaría el inicio de la regresión luteal inducida por el útero, pero rescatado por el embrión en desarrollo, en caso de hembras preñadas, quien produciría una señal para su reconocimiento maternal (Aba *et al.*, 1995). Por tanto, la presencia de un cuerpo lúteo funcional secretando progesterona, inhibe la presentación de celo en las hembras preñadas (Novoa y Leyva, 1996).

2.5.- Gametogénesis

2.5.1.- Oogénesis:

El control estricto de la proliferación y muerte celular es esencial para las funciones de diferentes poblaciones celulares en organismos multicelulares complejos. La oogénesis se caracteriza por una primera fase que ocurre durante la vida fetal y es común a la espermatogénesis, durante la cual la proliferación mitótica de las células germinales primordiales, predomina sobre la muerte celular programada. El resultado es la formación de un relativamente alto número de células germinales dependiendo de la especie, listo para entrar en diferenciación sexual específica (Smitz y Cortvrindt, 2002).

Las células germinales primordiales a las 3 semanas después de la fertilización migran por movimientos ameboides desde el epitelio del saco vitelino vía tejido conectivo del intestino embrionario a la cresta genital. Durante este viaje, las células primordiales germinales se multiplican rápidamente.

En humanos la cresta genital se forma durante las 3.5 a 4.5 semanas de gestación formada por una cubierta de mesénquima sobre el epitelio celómico. Alrededor de las 7 semanas de gestación las células provenientes de los mesonefros y del epitelio celómico migran hacia el interior de la cresta genital, formando el cordón medular primario y el cordón sexual (Smitz y Cortvrindt, 2002).

Los cordones, los cuales son anatómicamente menos definidos en hembras que en machos, son compactos en la región cortical del esbozo gonadal embrionario. Estos cordones primitivos son colonizados por las células germinales primordiales. En fetos hembras las células germinales primordiales son llamadas oogonias al arribar a las gónadas primitivas. Las oogonias

están aún interconectadas por puentes citoplasmáticos, luego los cordones primitivos medulares degeneran para ser reemplazados por un estroma ovárico altamente vascularizado. Las células del cordón proliferan y las células del mesénquima se condensan cerca de la oogonia para formar las células de la granulosa en los folículos primordiales (Smitz y Cortvrindt, 2002).

La actividad mitótica de la oogonia cesa y entra en meiosis (Byskov, 1986). Y entonces la oogonia es llamada oocito. Existe un factor de iniciación de la meiosis que deriva de las células del tejido mesonéfrico en crecimiento cuando se inicia la primera división meiótica. Después que el oocito entra en meiosis en el ovario fetal, estos pasan por la fase leptoteno, zygoteno y pachiteno antes de ser arrestado en el último estadio meiótico en profase I, el estadio de diploteno en el tiempo del nacimiento.

Durante el arrestamiento en profase I los cromosomas se descondensan y son empaquetados dentro de un núcleo conocido como vesícula germinal; el cual puede durar meses o años, dependiendo de las especies. Está ampliamente aceptado que en mamíferos una hembra nace con un número fijo de oocitos dentro del ovario, los cuales progresivamente decrecen sin la posibilidad para renovarse (De Felici *et al.*, 2005). De esta manera, la mayoría de oocitos mueren durante el período fetal inmediatamente después del nacimiento.

Los oocitos más pequeños en el ovario son rodeados por células de la granulosa de forma aplanada para formar los folículos primordiales. La primera señal que el oocito ha empezado la fase de crecimiento es el cambio morfológico en las células de la granulosa, el cual cambia a una forma cuboidal. y continúan desarrollando por una proliferación activa de estas células. En este momento los folículos son llamados primarios. Los folículos primarios unilaminares se convierten en folículos secundarios multilaminares seguidos por folículos antrales (terciarios) en la cual se forman una gran cavidad antral llena de fluido. Durante este período el oocito también crece, y la zona pelúcida inicia su formación alrededor de este. Adicionalmente, las células somáticas del tejido intersticial adyacente se diferencian en células de la teca y forman la envoltura celular más externa del folículo (Smitz y Cortvrindt, 2002).

El tamaño y el estadio del folículo en el cual el crecimiento del oocito se completa difieren entre las especies. Los oocitos de ratones desde que son folículos antrales tempranos completan su desarrollo, mientras que los oocitos de bovinos y porcinos completan su desarrollo en estadio antral tardío con un diámetro de aproximadamente 5 mm. (Motlik *et al.*, 1984; Hirao *et al.*, 1995). El desarrollo folicular acompañado del crecimiento del oocito es un proceso largo

que toma 3 semanas en ratones y cerca de 6 meses en vacas (Lussier *et al.*, 1987) desde el inicio del crecimiento de los folículos primordiales al estadio ovulatorio.

Durante cada ciclo reproductivo una población de oocitos completa su crecimiento, adquiere una zona pelúcida, y reanuda la meiosis para convertirse en un óvulo no fertilizado (Johnson *et al.*, 2004). Todos los oocitos no empiezan a crecer al mismo tiempo en los ovarios de los mamíferos; sólo una pequeña población de los oocitos en folículos primordiales inicia la fase de crecimiento y alcanzan su tamaño final antes de la pubertad. Después, que ha culminado el desarrollo de los folículos conteniendo oocitos que han terminado también su crecimiento, estos son aptos para responder al surgimiento gonadotrópico. Entonces los oocitos reanuden la meiosis, y progresan de profase I (estadio de vesícula germinal) a metafase II dentro de los folículos, para finalmente ser ovulados. Este curso meiótico desde la reanudación de la meiosis a metafase II es llamado “maduración del oocito”.

2.5.1.1 Formación de la Zona Pelúcida (ZP) del óvulo durante el crecimiento

La zona pelúcida es una estructura que puede representar mas del 10% del total de proteínas del óvulo, está compuesto de sólo unas pocas glicoproteínas, llamadas ZP1, ZP2 y ZP3, las cuales son sintetizadas, secretadas y se reúnen dentro de una ZP, solamente durante el crecimiento de los oocitos (Wasarman, 1988). El grosor ZP de la se incrementa conforme el oocito aumenta en diámetro (Johnson *et al.*, 2004).

La zona pelúcida se hace evidente primero como pequeñas zonas circunscritas de diferentes colores y extracelulares en forma de filamentos finos entre el oocito y las células de la granulosa. Se ha sugerido que cada proteína conocida de la zona pelúcida en al menos un vertebrado para mediar la unión del espermatozoide *in Vitro*, pero parece que hay pequeños consensos en las observaciones hechas en diferentes especies. En el ratón, tanto la ZP2 como la ZP3 han sido implicadas en los pasos iniciales para el reconocimiento de gametos. La mayoría de evidencias es que ZP3 (pero no Zp1 o ZP2), purificados por SDS-PAGE, inhiben la unión del espermatozoide al óvulo *in Vitro* de una manera dosis-dependiente (Wassarman, 1999).

Los oocitos de los folículos primordiales no tienen la habilidad de reanudar la meiosis; y casi todos los oocitos antes de alcanzar su tamaño final carecen de la habilidad de reanudar la meiosis (Hirao *et al.*, 1995). Esto podría deberse a que durante la fase de crecimiento, los oocitos sintetizan y acumulan proteínas específicas y mRNA requeridos para la reanudación de la meiosis y la subsecuente maduración.

El control hormonal y genético parecen regular la tasa de desarrollo folicular ovárico en cerdos de aproximadamente 31 días post coito hasta la pubertad a los 5 o 6 meses de edad. El desarrollo ovárico durante las fases tempranas del crecimiento folicular no depende de la acción de las hormonas gonadotrópicas y parecen ser reguladas genéticamente. En contraste, las fases tardías de crecimiento folicular, formación del antro y maduración preovulatorio del oocito si parecen estar reguladas por cambios en las concentraciones de las gonadotropinas (Oxender *et al.*, 1979).

Si nosotros podemos manejar el crecimiento del oocito, tales como oocitos pequeños en el ovario proveerían una nueva fuente de oocitos maduros para su uso en la producción ganadera, así como para programas de fecundación *in Vitro* (FIV).

2.5.2.- Espermatogénesis:

Tal como en el ovario la función y diferenciación testicular dependen del acercamiento de las células germinales dentro de un compartimiento específico (cordón testicular) la subsecuente diferenciación de los dos linajes celulares característicos (células de Leydig y células de Sertoli) dependen de la formación del cordón testicular: células de Leydig produciendo esteroides fuera del compartimiento y células de Sertoli secretando la Hormona Antimülleriana (AMH) dentro del compartimiento (Grier, 1992).

Cuando las células germinales masculinas forman parte del cordón testicular toman el nombre de preespermatogonia (Gondos, 1980). Si las células germinales no se unen al cordón testicular, ellas degeneraran. Sin embargo, el acercamiento de estas células germinales no necesariamente asegura la diferenciación normal. Durante el desarrollo testicular temprano la espermatogonia inicia las divisiones mitóticas, y simultáneamente sufren diferenciación morfológica.

En roedores las espermatogonias se reúnen en grupos, los que frecuentemente continúan dividiéndose mitóticamente de manera sincronizada después de la diferenciación testicular. Al igual que las oogonia, las espermatogonias están conectadas por puentes intercelulares.

2.5.2.1 Control de meiosis

En el macho, la meiosis no empieza antes de la pubertad. Este paradigma ha producido la teoría de que un “reloj interno” en células germinales de machos y hembras pueda regular la meiosis (Byskov y Hoyer, 1994). Proceso de división y diferenciación mediante el cual se producen espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos. La espermatogénesis se divide en tres fases: Espermatocitogénesis (mitosis), meiosis y espermiogénesis.

La espermatocitogénesis, involucra a los espermatogonias, que surgen post-natalmente a partir de los gonocitos y están localizados en la base de los túbulos. Existe tres tipos de espermatogonias: espermatogonia A, espermatogonias intermedias y espermatogonias B. Las espermatogonias tipo A se dividen por mitosis para producir otras células tipo A (Illera, 1994).

Las espermatogonias B se dividen para formar los espermatocitos primarios los cuales duplican su DNA y experimentan cambios nucleares progresivos de la profase meiótica conocidos como proleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno antes de dividirse para formar espermatocitos secundarios (Hafez, 1996). Posteriormente, sin una síntesis de DNA, los espermatocitos secundarios resultantes se dividen una vez más para formar las células haploides, conocidas como espermátidas.

La espermiogénesis, es la diferenciación morfológica de las espermátidas esféricas en espermátidas maduras, que se liberan a la superficie del lumen como espermatozoide (Illera, 1994). Entre los cambios que se dan en esta fase incluye la condensación de la cromatina nuclear, formación de la cola o aparato flagelar de los espermatozoides y desarrollo del casquete acrosómico. Las diversas etapas de la transformación de las espermátidas se dividen en cuatro fases: de golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración.

Al proceso de liberación de las células germinales (espermatozoides) formadas al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación (Hafez, 1996).

Un ciclo completo dependiendo del tiempo de las etapas, llamado ciclo del epitelio seminífero, se define como una serie de cambios en un área determinada de epitelio seminífero entre dos etapas del desarrollo (Illera, 1994; Hafez, 1996). Dependiendo de la especie, se requieren de cuatro a casi cinco ciclos epiteliales antes de que las espermatogonias tipo A del primer ciclo hayan completado la metamorfosis de la espermiogénesis.

Delhon y Lawzewitsch (1987) dividieron en ocho etapas el ciclo del epitelio seminífero de la llama, mediante un estudio histológico, y observaron que los túbulos seminíferos en promedio medían $223,07 \pm 19,8 \mu\text{m}$ de diámetro.

2.5.2.2 Control endocrino de la espermatogénesis

Para el funcionamiento testicular normal se requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias, las cuales a su vez son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo (Hafez, 1996).

De esta manera se inicia la descarga pulsátil de LH (Illera, 1994), y ésta estimula la producción y liberación de testosterona por las células de Leydig (Vaughan *et al.*, 2003). La testosterona parece actuar sobre las células somáticas de los túbulos seminíferos (células peritubulares y de Sertoli). Así comienza la formación secuencial de espermatocitos, espermátidas y espermatozoides, hasta que se produzca suficiente esperma para proporcionar el primer eyaculado en la pubertad (Illera, 1994).

Los andrógenos producidos también se difunden hacia las células de Sertoli adyacentes y hacia la sangre, donde ejercen retroalimentación negativa tanto en el hipotálamo como en la hipófisis para bloquear la liberación de LH adicional (Hafez, 1996).

La otra gonadotropina importante es la FSH, que estimula la producción de la Proteína Transportadora de Andrógenos (ABP) y de inhibina por las células de Sertoli. La proteína ABP tiene la función de formar un complejo con andrógeno (Testosterona), para luego ser transportada junto con los espermatozoides hacia el túbulo seminífero, y de esta manera permitir el normal funcionamiento del órgano. La inhibina por su parte tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre FSH, mas no sobre LH (Hafez, 1996).

2.6.- Fecundación e Implantación

Para que suceda la fecundación, que es la fusión del espermatozoide con el óvulo para formar el cigoto, debe ocurrir un proceso de múltiples pasos. El espermatozoide libre y capacitado debe inicialmente reconocer y unirse a la cubierta extracelular o zona pelúcida (ZP), del ovocito ovulado.

Luego debe fusionarse con la membrana plasmática del óvulo para formar el cigoto. Sólo aquellos espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica y penetran a través de la ZP son capaces de unirse y fusionarse con la membrana plasmática. Estos pasos múltiples involucra: interacciones receptor-ligando, modulación de canales de iones, fusión de membrana y proteólisis (Wassarman, 2003).

2.6.1- Unión especie-específica del esperma a la ZP del óvulo

Aunque la unión del espermatozoide mamífero al óvulo ovulado no es estrictamente especie-específico, la ZP del óvulo aparentemente representa una importante barrera para muchos investigadores. Esta restricción puede ser superada removiendo la ZP de los óvulos, usando proteasas o buffers de pH bajos, por lo que permite al espermatozoide unirse directamente y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo.

Ensayos han revelado que la ZP3 del oocito ovulado es activa como receptor de espermatozoides, pero las ZP3 de óvulos fertilizados o de embriones en estadio liberado es inactivo (Mortillo y Wassarman, 1991). Otros experimentos con ZP3 sugieren fuertemente que el reconocimiento y unión no del polipéptido de ZP3, sino a oligosacáridos ligados específicos unidos al polipéptido de ZP3 (Wassarman, 1990).

2.6.2.- Inducción de la Reacción del acrosoma por la ZP del óvulo

El acrosoma es una gran vesícula similar al lisosoma, que descansa sobre el núcleo del espermatozoide, es derivado del Aparato de Golgi durante la espermatogénesis. La reacción del acrosoma (RA), una forma de exocitosis celular, se caracteriza por múltiples fusiones de la membrana plasmática. Esto resulta en la producción de numerosas vesículas de membranas híbridas y expone a la membrana acrosomal interna y a sus componentes asociados.

Sólo el espermatozoide que ha sufrido la RA puede penetrar la ZP, probablemente usando una o mas proteasas presente en el acrosoma junto con el movimiento progresivo (movilidad). Además solamente el espermatozoide que ha sufrido la RA puede fusionarse con la membrana plasmática del óvulo usando la membrana plasmática que queda en la región posterior de la cabeza del espermatozoide. Muchas evidencias indican que la RA se completa después que el espermatozoide se une a la ZP del óvulo y se sugiere que uno o más componentes de la ZP inducen al espermatozoide a completar la RA.

Se piensa que la ZP3, el receptor del óvulo para el espermatozoide, también inducen al espermatozoide a completar la RA (Bleid y Wassarman, 1983). La ZP3 estimula la despolarización de la membrana del espermatozoide, y estos efectos no se dan con las otras glicoproteínas de la ZP, ni con los ZP3 de otras especies (Amoult *et al.*, 1996).

La RA incluye la activación de las proteínas G, la elevación momentáneo del pH interno, activación de la fosfolipasa C (PLC), y elevación momentánea de Ca^{2+} (Jungnickel *et al.*, 2001). Interesantemente, parece que, en presencia de Ca^{2+} , algunas exocitosis acrosomales espontáneas ocurren, durante la capacitación; un proceso que el espermatozoide sufre en el tracto reproductivo de la hembra, que los capacita para unirse al oocito ovulado y completar la RA (Florman *et al.*, 1999).

2.6.3.- Fecundación y desarrollo temprano

El espermatozoide con acrosoma intacto pasa a través de la envoltura del cúmulo oóforo compuesto de la sustancia intercelular rica en glucosaminoglicanos y en células del cúmulo. La unión inicial del espermatozoide a la zona pelúcida, que es la que inicia la reacción acrosomal, que se da por una liberación de enzimas líticas desde la cabeza del espermatozoide, que se piensa, modifica al espermatozoide, la zona de la sustancia intercelular o ambos, para facilitar la unión continua y la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide.

El espermatozoide con reacción acrosomal después se fusiona con la membrana plasmática del huevo, entra al citoplasma y forma el pronúcleo masculino del cigoto de una célula. La fusión huevo – espermatozoide induce a los gránulos corticales, localizados en la periferia del huevo, a fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido dentro del espacio perivitelino. Esto resulta en una modificación de la zona que previene las subsecuentes uniones con otros espermatozoides (evita penetración).

Los pronúcleos femenino y masculino del cigoto de una célula se fusionan durante la singamia, duplica su DNA y continúa la citogénesis, formando el embrión de dos células, por este tiempo se activa el genoma embrionario y la mayoría de productos de genes maternos son degradados. Después de dos o tres divisiones celulares el embrión de 12 -16 células, sufre una reacción de compactación mediada por Ca^{2+} que resulta en la formación de la mórula. Luego de varias divisiones celulares se desarrolla una cavidad en el centro del embrión (blastocelo), este toma el nombre de blastocisto, el que ingresa dentro de la cavidad uterina.

Durante el estadio de desarrollo de preimplantación, el embrión permanece envuelto por la zona pelúcida, sin el cual el embrión en estadio muy temprano es incapaz de atravesar el oviducto (Modlinski, 1970). Justo previo a la implantación el embrión escapa de la zona pelúcida mediante un mecanismo aún no descrito completamente. De esta manera, la zona pelúcida juega un rol clave en eventos de la fecundación relativamente especie-específicos, en el bloqueo post-fecundación para la poliespermia y en el pasaje por el oviducto.

2.7 RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ

2.7.1 Reconocimiento Maternal de la Preñez

El éxito para el establecimiento de la preñez requiere de señales de reconocimiento producidas por el conceptus (embrión/feto y membranas extraembrionarias asociadas), para el mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional, la diferenciación y función endometrial, y la receptividad del útero durante implantación del conceptus (Burghardt *et al.*, 2002; Spencer y Bazer 2002, 2004).

El conceptus produce esteroides, prostaglandinas, proteínas y posiblemente otros agentes no identificados que pueden jugar un rol en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. En especies como en porcinos, equinos y rumiantes el mecanismo de reconocimiento maternal de la preñez (RMP) ha sido bien descrito (Bazer *et al.*, 1986), pero en camélidos sudamericanos aún no.

En rumiantes, el interferón τ (IFN)- τ es la señal para el RMP secretado por el conceptus elongado (Bazer *et al.*, 1997). Además de su acción antiluteolítica, el IFN- τ actúa sobre el endometrio para inducir y aumentar la expresión de varios genes (genes estimulados por IFN- τ o ISGs), que se sugiere regulan la receptividad del útero para la implantación y el desarrollo del conceptus (Hansen *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2004b). La elongación del blastocisto es de suma importancia para la producción regulada del interferón (IFN)- τ , para la señal de reconocimiento de la preñez, y para que sea posible la implantación (Guillomot *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 2002).

La producción de IFN y el tamaño del conceptus está positivamente relacionadas; por tanto, el IFN podría ser un factor clave en la proliferación de Células Mononucleares del Trofoblasto (Robinson *et al.*, 2006). Algunos factores de crecimiento derivados del útero que

estimulan la producción de IFN- τ en conceptus cultivados y células mononucleares del trofoectodermo aisladas, incluyen el factor estimulador de colonias (CSF) 2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)2, factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) y IGF2 (Michael *et al.*, 2006).

En vacas el RMP ocurre a partir del día 16 de gestación y en ovejas entre el día 12 y 22 (Bazer *et al.*, 1986; Lamming *et al.*, 1995). Para lo cual es necesaria una señal de origen embrionario. Esto puede confirmarse con la presencia de diversos factores que revelan la capacidad sintética proteica del blastocisto ovino de 14 días. Similarmente, en embriones bovinos de 13 días se observó la presencia de organelas asociadas con la síntesis de proteínas tales como retículo endoplasmático rugoso y grupos de ribosomas (Mohr y Trounson, 1981).

En la cerda el conceptus sintetiza y secreta estrógenos, el cual protege la función del cuerpo lúteo (Bowen y Burghardt, 2000). Este estrógeno no evita la liberación pulsátil de PGF2 α , sino que redirecciona su secreción, y en vez de secretarse en la vasculatura endometrial, es secretada en el lumen del útero; es decir, que pasa de ser de secreción endocrina a ser exocrina. De esta manera se evita que la PGF2 α pase a circulación y llegue al ovario para producir lutéolisis (Arthur, 1991; Hafes, 1996). Young *et al.* (1989) han establecido que los estrógenos secretados entre los días 11 y 16 por el embrión porcino, incrementan los receptores de prolactina en el endometrio y esta hormona empezaría el flujo iónico para el calcio, que es el promotor de la secreción exocrina de lo PGF2 α dentro del lumen uterino.

La acción del IFN- τ es prolongar el bloqueo de P₄ y mantiene los niveles de los receptores de E₂ y de oxitocina bajos (Bowen y Burghardt, 2000). Spencer *et al.* (1996) propusieron que el IFN- τ podría bloquear la formación de receptores de E₂ y por tanto la producción del receptor de oxitocina mediante los siguientes mecanismos:

- 1) Evitando la regulación negativa de la P₄ sobre su propio receptor, es decir, se prolonga la expresión del receptor de P₄.
- 2) Inhibiendo la expresión del gen del receptor de estrógeno; y por tanto, permite el mantenimiento del CL y que la preñez continúe.

En el camello dromedario (*Camelius dromedarius*) se ha encontrado que la reducción de la PGF2 α está asociada al RMP, a través de una señal enviada por el embrión antes del día 10 post-ovulación (Skidmore *et al.*, 1998).

Estudios en embriones de 8 a 22 días post ovulación en esta especie, en el cual incubaron membranas extra-embionarias, indicaron que estas producían proteínas funcionales. Estas proteínas fueron diferentes del interferón de ovino y bovino, pero tenían una alta actividad aromatasas con la consiguiente producción de estradiol 17- β . Por tanto, sugirieron que los estrógenos serían los responsables de provocar la señal de RMP y el mantenimiento de la función luteal (Skidmore y Allen, 1994). Un mecanismo de RMP similar podría darse en Camélidos Sudamericanos, debido a su cercana relación filogenética.

El RMP en llamas y alpacas se asume que se produciría entre los 8 y los 18 días post-monta, basándose en los cambios endocrinos producidos en este período, tales como: la disminución de los niveles de progesterona sanguínea, la elevación de concentraciones de estradiol sérico y el incremento en los niveles de PGF2 α (Aba *et al.*, 1995).

2.7.2 Desarrollo embrionario temprano e implantación

El establecimiento de la preñez en ovejas y otros rumiantes comienza en el estadio de blastocisto e involucra señales coordinadas de reconocimiento de la preñez e implantación del conceptus. En ovejas, el embrión en estadio de mórula ingresa al útero en los días 4-5 y es un blastocisto formado por el día 6, el cual contiene un blastocele rodeado por una monocapa de trofoectodermo (Guillomot 1995; Spencer *et al.*, 2004b; Spencer *et al.*, 2007). Después de la eclosión o liberación de la zona pelúcida al día 8, el blastocisto desarrolla hacia una forma tubular por el día 11. En el día 12, el blastocisto empieza a alargarse, alcanzando 10 cm o más de longitud en el día 14, y 25 cm o más por el día 17.

Alrededor del día 14 en el conceptus ovino, aparecen las células conocidas como células binucleadas gigantes del trofoblasto (Wooding, 1984) y se piensa que provienen de las células del trofoectodermo mononucleadas mediante consecutivas divisiones nucleares sin citocinesis (Wooding, 1992), también llamado poliploide mitótico. Entre los días 16 y 24, las células columnares simples del epitelio luminal del endometrio se transforman en placas sincitiales, la cual resulta de la migración de las células binucleadas gigantes del trofoblasto hacia la unión de las microvellosidades y se fusionan con las células del epitelio luminal uterino individuales para producir las células híbridas feto maternas trinucleadas (Wooding, 1984). La migración y fusión continúa de las células binucleadas gigantes con las células trinucleadas, junto al desplazamiento y/o muerte del epitelio luminal uterino remanente, da lugar a las placas sincitiales multinucleadas que cubren las carúnculas por el día 24.

Se reporta que este sincitio caruncular, el cual no tiene división nuclear, se expande durante la formación y mantenimiento de los cotiledones. presumiblemente acumulando un buen número de núcleos provenientes de la fusión y migración de las células binucleadas gigantes. Las células binucleadas gigantes tienen dos funciones importantes: (1) formación de un sincitio híbrido fetomaterno para lograr la implantación y el subsecuente crecimiento cotiledonáreo en el placentoma; y (2) síntesis y secreción de hormonas esteroideas, tales como la hormona somatomamotropina coriónica 1 (CSH1); también conocida como el lactógeno placentario, glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs) y progesterona (Wooding, 1992). El CSH1 se une a receptores de prolactina únicos en las glándulas uterinas y estimulan su crecimiento y/o funciones diferenciadas durante la preñez (Spencer *et al.*, 2004c).

Hay tres etapas o estadíos que suceden en el conceptus: Ovoide, tubular y filamentoso. Las funciones biológicas más importantes detectadas en un estudio en el crecimiento de los embriones durante estas tres etapas fueron: Síntesis proteica, transporte proteico, modificación post-transcripcional de ARN, transporte molecular, y crecimiento y proliferación celular (Hue *et al.*, 2007). Es durante la transición de etapa tubular hacia filamentosa en que ocurre la mayor parte de la diferenciación de células mononucleares a células gigantes del trofoblasto en el período de transición del embrión (Blomberg *et al.*, 2008).

Desde el día 30 en adelante, los cambios en la interfase materno-embionaria, fueron más complejas, pudiéndose observarse la formación de interdigitaciones entre las membranas del trofoblasto y del epitelio. Entre los días 30 y 45 se evidencian varios gránulos secretorios en el epitelio uterino, mientras que células multinucleadas aparecen interpuestas entre las células trofoblásticas remanentes, mostrando intensa actividad fosfatasa alcalina, también depósitos conteniendo fierro y gránulos PAS-positivos (Bowen y Burghardt, 2000). Todas estas características sugieren que las células epiteliales se hacen más activas durante la preñez, procesando material específico para ser liberado a la interfase materno-fetal (Olivera *et al.*, 2003).

Alrededor del día 30 también se observa que la capa trofoblástica está revestida por un tejido conectivo extraembrionario, el cual por el día 45 está bien vascularizado, lo que indica el punto de inicio de la formación placentaria. Los capilares maternos y fetales hacen depresiones en el trofoblasto y en el epitelio, estrechando las áreas especializadas de intercambio, los cuales se disponen a lo largo de toda la interfase materno fetal, lo que caracteriza la difusión natural de la placenta (Bowen y Burghardt, 2000).

En animales preñados las secreciones de las glándulas pueden ser muy importantes para la nutrición del embrión y otras funciones específicas. En ovinos, las células glandulares producen osteopontina, el cual se une a la integrina $\alpha_v\beta_3$ presente en la superficie epitelial del útero y al parecer media la interacción entre estas células y el trofoblasto durante la implantación (Jonson *et al.*, 1999; Bowen y Burghardt 2000), mientras en cerdos, la uteroferrina, una glicoproteína que contiene hierro, está presente en las secreciones de las glándulas.

2.7.2.1 Implantación

La implantación en mamíferos refiere una serie de interacciones coordinadas que se inician con el contacto íntimo entre las membranas plasmáticas apicales del trofoectodermo del conceptus y el epitelio luminal uterino, y concluye con la formación de una placenta como un soporte del desarrollo embrionario fetal a través de la preñez. La implantación se acompaña de una extensiva remodelación de la matriz celular y extracelular (Bowen y Burghardt, 2000).

Antes de cualquier contacto celular, se establecen secreciones del embrión y del endometrio uterino que ejercen una influencia mutua para soportar el desarrollo posterior del concepto. Todos los úteros mamíferos contienen un epitelio endometrial que sintetiza y secreta o transporta una mezcla de complejos de aminoácidos, iones, glucosa, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, proteínas transportadoras y otras sustancias denominadas histotrofo (Bazer, 1975). Por tanto, factores que soportan el crecimiento pre y peri-implantación del blastocisto y la elongación del conceptus, se piensa que son obtenidos primariamente del histotrofo uterino (Guillomot, 1995).

De acuerdo a Guillomot (1995), las fases de la implantación incluyen: (1) Liberación de la zona pelúcida; (2) precontacto y orientación del blastocisto; (3) aposición; (4) adhesión; (5) invasión endometrial. Cada una de estas fases ocurren en los rumiantes domésticos, pero la fase de invasión endometrial es muy limitada.

La aposición del trofoectodermo del conceptus y del epitelio luminal endometrial en ovinos sucede entre los días 9 y 14, y este es seguido primero por la unión y después por la interdigitación citoplasmáticas de las células del trofoectodermo y de las microvellosidades del epitelio luminal endometrial, el cual asegura una adhesión firme tanto en las áreas caruncular e intercaruncular por el día 16 de preñez.

2.7.2.2 Elongación embrionaria

La elongación o expansión del trofoblasto requiere un área de superficie de placenta muy grande para facilitar el área de intercambio de nutrientes e intercambio materno-fetal, el que es esencial para la sobrevivencia del conceptus. Acompañando la elongación se da la degradación de la envoltura de las células del trofoblasto que cubren el disco embrionario, exponiendo las células del disco embrionario a la milieu materno (Guillomot *et al.*, 2004).

En el blastocisto ovino y bovino la elongación del trofoblasto se inicia alrededor del día 11 y 12 de gestación, respectivamente, y la transición de una morfología ovoide a filamentosos se completa después de varios días (oveja a los 16; en vacas a los 18 días de gestación; Bazer *et al.*, 1993). La elongación del blastocisto y crecimiento del trofoectodermo requieren del útero, ya que el blastocisto eclosionado y la vesícula trofoblástica no elongan *in Vitro*, pero si lo hacen si son transferidos a úteros (Heyman *et al.*, 1984; Flechon *et al.*, 1986).

El conceptus bovino incrementa su tamaño unas 1000 veces durante la elongación (Maddox *et al.*, 2003), acompañado de un aumento del número de células y síntesis proteica (Thompson *et al.*, 1998).

Aún, se conoce poco sobre las señales de iniciación para la elongación y para la interacción molecular entre el disco embrionario y el tejido extraembrionario que determina el éxito del desarrollo del conceptus durante la elongación, y por tanto, hace posible la implantación. Varias tipos de moléculas son muy probables que participen en la elongación y en el proceso de diferenciación.

En porcinos se ha reportado una pérdida de la gestación de un 20 % durante el proceso de elongación inicial, el cual se indica es un período crucial para el desarrollo en esta especie (Bennett y Leymastes, 1989).

2.7.2.3 Migración celular y emergencia del eje del cuerpo en el disco embrionario

En ungulados durante la elongación del trofoblasto se produce el crecimiento y diferenciación del Macizo Celular Interno (MCI) hacia un disco embrionario (inicio de la gastrulación). Mientras el tejido extraembrionario prolifera durante las fases de blastocisto tardío, paralelamente se da el primer cambio morfológico del disco embrionario (Gástrula);

aparecen las células del mesodermo y la primera capa germinal en la línea primitiva orientada longitudinalmente en la mitad posterior del disco embrionario. Luego de la aparición del mesodermo y de la línea primitiva, se produce en la zona craneal un ligero crecimiento (Viebahn *et al.*, 1995).

Junto a la fase de extensión de gástrula posterior, en la cual la morfología total del disco embrionario cambia de una orientación transversal ovalada a una longitudinal, tres fases de gastrulación inicial puede distinguirse en base a las características morfológicas (Viebahn *et al.*, 2002). En la primera fase, el movimiento de estas células que se originan de la proliferación circular de la mitad posterior son dirigidos básicamente hacia el margen posterior, de este modo provocan la elongación posterior (extensión gastrular posterior) del disco embrionario.

Durante la segunda fase, y en nueva área generada de la extensión gastrular posterior, los movimientos parecen ser más complejos en el que, en vez de un movimiento de masa simple hacia el polo posterior, las células vecinas individuales parecen moverse en direcciones opuestas. Esto contribuye a la elongación de la línea primitiva en la línea media del embrión.

En estadíos tardíos del blastocisto, los movimientos en las células de la capa inferior (llamada endodermo primitivo en el ratón e hipoblasto en los mamíferos no roedores) son difícilmente observados. Sin embargo, hay un movimiento general del hipoblasto (endodermo primitivo) hacia el polo anterior, aún más allá del margen anterior. (Thomas y Beddington 1996, Rivera-Pérez y Magnuson, 2005).

2.7.2.4 Implantación en Camélidos Sudamericanos y Dromedarios

En el estudio llevado a cabo por Olivera *et al.* (2003) se describe los cambios que sufre la interfase materno-embrionaria durante la preñez temprana en alpacas, este contribuye al entendimiento del proceso de desarrollo embrionario inicial.

El trofoblasto del conceptus observado en el período de desarrollo embrionario forma una simple capa de células columnares, la mayoría de la cuales son monocucleares y presentan características de intensa actividad biosintética y de intercambio de gas y nutrientes. Las células mononucleares también muestran signos de actividad endocitotónica y fagocitótica, lo que podría implicar un rol en el transporte y procesamiento de material desde el organismo materno hacia el fetal y viceversa (Olivera *et al.*, 2003).

En este mismo trabajo de Olivera *et al.* (2003) es posible observar figuras mitóticas tales como células binucleadas y células poliploides, las cuales son escasas en las fases iniciales de la gestación y más numerosas con la progresión de la preñez. En caso de las células epiteliales uterinas en general exhiben características de intensa actividad biosintética, sin embargo, las variaciones en las capas subcelulares dependen de la fase de gestación, probablemente debido a los cambios hormonales. La densidad de las células en el estroma, por debajo de la capa epitelial, es muy notoria. Es posible, como se sugiere en ratonas (Hunt *et al.*, 2000; Kimber, 2000), que estas células estén relacionadas a la presencia de citoquinas y factores de crecimiento que se requieren para un buen proceso de implantación y placentación.

La expansión capilar, vista en ambos lados de la estructura placentaria, refleja un incremento en el requerimiento de oxígeno durante los estadíos de preñez temprana. Estas estructuras son mucho más cercanas a la membrana basal epitelial que en las no preñadas, por tanto favorecería el intercambio molecular placentar. (Olivera *et al.*, 2003).

Al día 15 de preñez, el blastocisto de alpacas es completamente libre dentro del lumen uterino, con una implantación que se evidencia alrededor del día 20. Los primeros pasos de la implantación embrionaria en camélidos sudamericanos es muy probable que ocurra en un patrón de ondas antes del día 22 de preñez en el cuerno izquierdo como una fase de aposición. Este después, se extiende al cuerno derecho seguido por una fase de unión o adhesión, el cual también ocurre primero en el cuerno izquierdo. Durante los días 22 y 26 de gestación, se observa el trofoblasto yuxtapuesto a la superficie epitelial del útero, con áreas de contacto y adhesión por medio de un complejo de interdigitaciones (Olivera *et al.*, 2003).

Al día 30 de preñez, la superficie apical del trofoblasto perfora más las microvellosidades uterinas. Por los días 30 y 45 los capilares maternos muestran un gran desarrollo con una aproximación hacia la membrana basal del epitelio del útero.

Al día 45 de gestación, la mucosa endometrial muestra invaginaciones profundas y de forma oval, de varios tamaños, complementario al crecimiento de la vellosidades coriónicas, mientras que el espesor del endometrio va disminuyendo; probablemente debido al estrechamiento del útero por la presencia del embrión en desarrollo (Olivera *et al.*, 2003). A pesar de que al día 45 hubo una cercana unión del trofoblasto al epitelio uterino, no hubo evidencia trofoblástica directa, hacia el endometrio, ni unión intercelular entre el trofoblasto y las células epiteliales.

Por este mismo día, el patrón de interdigitación también incrementa en complejidad. Particularmente en alpacas, los grupos de células epiteliales uterinas dispuestas a lo largo de la interfase materno-embionaria parecen formar lugares adicionales para la adhesión. Fowler y Olander (1990) también notaron formaciones similares en llamas (al día 90 de preñez), pero sobre la superficie trofoblástica, y sugieren que estas estructuras son mas importantes en este especie para fortalecer la adhesión materno –fetal.

En dromedarios (*Camelos dromedarius*) la implantación del embrión parece comenzar al día 14 después de la ovulación, cuando los trofoblastos se ponen más en contacto con el epitelio uterino, resultando en una interacción bien desarrollada con el tejido endometrial alrededor del término del primer mes de gestación (Skidmore *et al.*, 1996). El contacto e interacción entre los tejidos materno y fetal de camellos que se reporta en fetos, comprende las fases de pre-aposición, aposición y adhesión (Abd-Elnaeim *et al.*, 1999).

Estudios en implantación y placentación de camélidos reportados hasta ahora, muestran claramente que el proceso de implantación empieza en alpacas antes del día 30 de preñez, (Fowler, 1989, Jonson 1989) y es por lo tanto, similar al tiempo de implantación en dromedarios (Skidmore *et al.*, 1996). Estas características reportadas durante el desarrollo temprano embrionario muestran las semejanzas durante el proceso de implantación entre camélidos sudamericanos y camellos. Sin embargo, la fase de unión o adhesión en alpacas no exhibe regiones específicas lisas, semi -lisas o rugosas en relación a la presencia o ausencia de microvellosidades, como si se da en dromedarios (Abd – Elnaein *et al.*, 1999).

2.7.3 Transcriptos Derivados Maternalmente (ARNm maternos)

La transición materno-embionaria es el período de tiempo durante el desarrollo embrionario que transcurre desde la fertilización hasta cuando el control de la embriogénesis temprana pasa de ser regulada por factores derivados del oocito, a ser regulada por los productos del genoma embrionario (Bettegowda *et al.*, 2008).

Los oocitos arrestados en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica acumulan un gran número de ARNm y proteínas sintetizadas. Estas moléculas almacenadas en los oocitos cumplen una función reguladora activa para promover el inicio de las divisiones de segmentación, luego de la fertilización, antes de la activación del genoma cigótico/embionario. La activación del genoma forma nuevas transcripciones, importantes para el subsecuente normal

desarrollo embrionario (Matzuk *et al.*, 2002; Bettegowda y Smith 2007). La activación del genoma embrionario de embriones bovinos ocurre aproximadamente en el estadio de 8 a 16-células (Misirlioglu *et al.*, 2006).

La transición materno-embrionaria en conejos y ratones sucede entre los estadios de 8 a 16 células y de 2 células, respectivamente (Telford *et al.*, 1990). Se ha sugerido que el inicio de la transcripción embrionaria en especies mamíferos no es un evento restrictivo a un estadio específico de la embriogénesis, sino que se da paulatinamente antes que se produzca la activación completa de la transcripción del genoma embrionario (Latham y Schultz, 2001).

Aunque la degradación de ARNm maternos se inicia durante la maduración meiótica, y puede cesar después de reiniciar la meiosis (Paynton *et al.*, 1988). En la ratona, la maduración meiótica promueve la degradación selectiva de los transcritos maternos (Su *et al.*, 2007). En un estudio utilizando la técnica de PCR se identificaron genes expresados en oocitos MII y en embriones de diferentes estadios de desarrollo temprano; y se observó que cuatro de los genes expresados en los oocitos MII declinaron notablemente conforme avanzaban las etapas de desarrollo embrionario (Cui *et al.*, 2005).

Por ello, la mayoría de transcritos maternos que sufren rápida degradación luego de la fecundación, se expresan sólo en el genoma del oocito, mas no durante el desarrollo preimplantación (Alizadeh *et al.*, 2005). Sin embargo, la degradación de ARNm maternos puede continuar aún durante la embriogénesis temprana en las especies mamíferas.

Entre algunos de los genes maternos identificados hasta la fecha tenemos al llamado *Mater* (Maternal antigen that embryos require), transcripto en oocitos en crecimiento (Tong *et al.*, 2000) y aunque su ARNm es degradado durante la maduración meiótica, la proteína *Mater* persiste hasta el estadio de blastocisto. La ratona hembra carente esta proteína citoplasmática (125 kDa) no producen crías debido a un bloqueo embrionario debido a un bloqueo en la etapa de segmentación temprana (Tong *et al.*, 2004).

El ARNm de otro gen materno, *Zar I* (zigote arrest I), identificado en ratones está presente en oocitos y embriones de una célula, pero disminuyen significativamente en el estadio de dos células y no son detectados en estadios de desarrollo mas avanzados. Otro gen materno de mamíferos conocido con el nombre de *Stella* (Stem cell enriched protein), es un gen que se expresa en células germinales primordiales, oocitos, embriones de implantación y en células pluripotenciales. Hembras *Stella*-deficientes exhiben una severa y reducida fertilidad debido a la

falta de esta proteína en sus oocitos y embriones, mostrando un compromiso en el desarrollo pre-implantación y rara vez alcanza el estadio de blastocisto (Payer *et al.*, 2003).

Los ARNm maternos son específicos de los oocitos, pero su persistencia o ausencia en algunas especies podrían ser determinantes para el desarrollo temprano después de la fertilización.

2.7.4 Regulación de progesterona durante el desarrollo embrionario temprano

El mecanismo celular y molecular que regula la aposición y la unión transitoria del trofoectodermo al epitelio luminal endometrial, se ha propuesto que son mediados por factores progesterona-dependientes de origen endometrial, así como por la secreción de hormonas placentarias (Guillomot, 1995).

La progesterona estimula y mantiene las funciones necesarias para el crecimiento, implantación, placentación y desarrollo a término del conceptus (Spencer y Bazer, 2002; Spencer *et al.*, 2007). Las concentraciones circulantes de progesterona afectan la sobrevivencia y crecimiento del blastocisto durante la preñez temprana (Mann y Lamming 1999; Mann *et al.*, 2006).

En vacas, el éxito en el establecimiento de la preñez y el desarrollo del blastocisto se correlacionan con la elevación de progesterona, por el contrario, vaquillas y ovejas con bajas concentraciones de progesterona durante la fase luteal temprana, tuvieron conceptus retardados y secretando menos IFN- τ (Mann y Lamming 2001).

Por tanto, los cambios progesterona-dependientes en el histotrofo uterino es probable que medien los efectos estimulatorios de la progesterona para la sobrevivencia y crecimiento del blastocisto (Lee *et al.*, 1998).

2.7.5 Endocrinología y Bioquímica de la etapa embrionaria

a) Factores Endocrinos:

En llamas preñadas, la progesterona secretada por el cuerpo lúteo ejerce un efecto negativo sobre la actividad folicular por reducción del estradiol 17 β (Aba *et al.*, 1995). Estos

niveles incrementan a medida que avanza la preñez, lo que sirve de soporte para el desarrollo del embrión (Fernández – Baca *et al.*, 1970b). Los niveles de progesterona en llamas preñadas son al día 0 de $0,3 \pm 0,1$ Nmol/L, $0,9 \pm 0,2$ Nmol/L al día 4 y 12, 1 ± 1 Nmol/L, al día 8, presentando un descenso entre los días 8 y 18 (Aba *et al.*, 1995). Adams *et al.* (1991) reportaron concentraciones de progesterona elevada hasta el término de su estudio (día 60 de gestación).

La concentración de estradiol 17β en llamas disminuyen de 46 ± 10 pmol/L en el día del empadre hasta niveles mínimos de detección $6 \pm 0,4$ pmol/L al día 4 de gestación; luego se eleva al día 8 alcanzado su pico (11 ± 2 pmol/L) a los días 11 – 13; disminuyendo posteriormente al día 19 (Aba *et al.*, 1995). En tanto, las concentraciones de PGF 2α se incrementan ligeramente alrededor del día 9 de gestación (Aba *et al.*, 1997).

El progreso de la preñez por la etapa peri-implantación requiere una liberación controlada de estrógenos; el incremento de los estrógeno por encima de los niveles normales en un momento inadecuado o por encima de los niveles fisiológicos pueden terminar con la gestación o demorar el desarrollo embrionario, respectivamente (Cárdenas *et al.*, 1997). En porcinos los embriones asincrónicos y retrazados durante la elongación tienen mayor riesgo de pérdida (Bazer *et al.*, 1993).

El E $_2$ podría estar involucrado en el reconocimiento maternal de la preñez, mientras que el IL1 B podría ser la responsable de la supresión de la respuesta inmune celular materna para prevenir el rechazo del conceptus (Ross *et al.*, 2003; Blomberg *et al.*, 2005). Adicionalmente, la IL1 B podría modular la síntesis de E $_2$ por medio de la estimulación de la aromatasa (Nestler 1993).

b) Factores Bioquímicos

La interacción que está involucrada en la aposición y adhesión del conceptus y el epitelio luminal uterino, el cual provoca la implantación epitelicorial, podría constituir una cascada de adhesión- implantación con eventos centrales que son comparables a otras cascadas de adhesión tales como la interacción endotelial-leucocito (Kimber *et al.*, 1994).

Las moléculas que funcionan para iniciar las cascadas de adhesión son derivados de varias familias de moléculas que incluyen receptores de citoquinas y metabolitos lipídicos (Schwartz *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1995). Estas moléculas son regulados por la acción de

esteroides, factores de crecimiento, citoquinas y por señales paracrinas del conceptus (Bowen y Burghardt, 2000). Así tenemos que en trofoblastos de embriones porcinos y de ratones el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF α) se ha encontrado que tienen funciones autocrinas y paracrinas, relacionadas a la elongación del mismo (Vaughan *et al.*, 1992).

Durante la fase de pre-receptividad, el blastocisto es libre para moverse dentro del útero, una condición que parece darse en varias especies por la naturaleza no adhesiva de la glicoproteína Muc-1. Debido a su gran tamaño, Muc -1 podría inhibir la interacción entre las moléculas de adhesión del embrión con las moléculas de adhesión del epitelio uterino (Bowen y Burghardt, 2000).

Otras moléculas que parecen jugar un rol en la implantación epiteliocorial son las integrinas, que son proteínas de membranas que pertenecen a la familia de las glicoproteínas y son secretadas por las glándulas uterinas. Integrinas como la fibronectina, vitronectina y osteopontin, se encuentran en el lumen uterino de varias especies domésticas, sobre las superficies de las células del epitelio uterino y/o del trofoectodermo.

En cerdos se ha relacionado la presencia de la glicoproteína endometrial básica (Gp 30) al tiempo de adhesión del conceptus al epitelio uterino y a la sobrevivencia de este (Bowen y Burghardt, 2000).

El uteroferrin es otra glicoproteína presente en las secreciones de las glándulas, que contiene hierro, el cual puede ser internalizado por el trofoblasto durante la hematopoyesis (Raub *et al.*, 1985). En un estudio realizado en alpacas también se evidenció histológicamente depósitos de hierro, en las glándulas uterinas y en el citoplasma de las células de trofoblasto y podrían tener un mecanismo o función similar al de los cerdos (Olivera *et al.*, 2003).

Larson y col. (1992) sugirieron que la fibronectina y su receptor se expresaban en la superficie de embriones bovinos de 8 células producidas *in Vitro*, las que desarrollaron hasta más allá del estadio de 16 células, dependiendo de la presencia de fibronectina.

2.7.6 Mortalidad embrionaria

Luego de la fecundación y habiéndose formado el embrión, existe la posibilidad que éste no sobreviva, esto es lo que se conoce como mortalidad embrionaria. La mortalidad embrionaria es la causa de la mayor parte de las fallas reproductivas en todas las especies, y en el bovino hasta el 40 % de los embriones pueden morir (Diskin y Sreenan, 1980)

Entre una de las causas de mortalidad embrionaria tenemos:

- **El envejecimiento de los gametos.** La asincronía entre los ovocitos y los espermatozoides, debido a una ovulación muy tardía o una monta muy retrasadas. Esto ocasiona el envejecimiento de los gametos, pudiéndose producir fallas cromosómicas que harían al embrión no viables (O' Farrel *et al.*, 1983).
- **Fallas cromosómicas,** en vacas podría ser otra causa de mortalidad embrionaria temprana. Analizando 683 embriones bovinos, se reportó un 13,3 % de anormalidades cromosómicas en embriones de 7 días, en oposición a sólo un 1,3 % de anormalidades encontradas en embriones de 12 días (King, 1990). Además de las anormalidades cromosómicas los embriones pueden ser portadores de genes letales recesivos, mutaciones letales y genotipos maternos y paternos incompatibles (Silva, 1994).
- **Fallas en el ambiente materno,** para que el embrión que llega al útero se anide y desarrolle es necesario que exista una adecuada secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo. Así lo demuestran algunos experimentos como el realizado por Remsen *et al.* (1982) en el que determinaron que embriones transferidos a vaquillas receptoras con menos de 2 ng/ml de progesterona sobreviven en un 20 %, mientras que los transferidos a vaquillas con progesterona plasmática entre 2 y 5 ng/ml sobreviven en un 74 %. De acuerdo a esto la mortalidad embrionaria podría estar causada en algunos casos por una respuesta uterina insuficiente a niveles de progesterona normales.
- **Efecto nutricional,** Los efectos de las deficiencias nutricionales en la reproducción han sido claramente establecidos. En vacas se ha determinado que los niveles de progesterona son menores en vacas subalimentadas que en vacas con alimentación balanceada (Hill, 1970). La respuesta a inyecciones de GnRH para producir liberación de LH también es menor en vacas subalimentadas (Whitaker *et al.*,

1993). La falta de energía sería entonces la principal causa de los problemas de fertilidad. La proteína no parece ser importante, e incluso un exceso puede ser negativo. Algunos trabajos han reportado que un aumento en el porcentaje de proteína cruda en la ración de la vaca aumentan los servicios por preñez y la preñez al primer servicio. Y postulan que el aporte excesivo de proteína en la dieta puede afectar la reproducción, ya que productos del metabolismo del nitrógeno en el rumen (amoníaco, urea) podrían afectar, una vez absorbidos, la sobrevivencia de gametos y embriones (Canfield *et al.*, 1990; Ferguson y Chalupa, 1989).

En bovinos se ha demostrado que la nutrición tiene un efecto directo sobre la calidad del oocito y en el desarrollo embrionario temprano; debido a que, influiría en la expresión de los patrones genéticos de los factores intrafolliculares que participan en la maduración del oocito (Nebb *et al.*, 1999).

2.7.6.1 Mortalidad embrionaria en Camélidos Sudamericanos

En camélidos sudamericanos los porcentajes de mortalidad embrionaria son elevados (Fernández - Baca *et al.*, 1970b). Los primeros 3 días post monta se presentan porcentajes altos de fertilidad (85%), pero alrededor del día 30 de gestación disminuye hasta un 35%; es decir, que se produce una pérdida embrionaria del 50 % (Fernández – Baca, 1971).

Los factores responsables de la alta pérdida, son aún desconocidos, pero las restricciones nutricionales, desbalances hormonales, aberraciones cromosómicas, factores inmunológicos, inadecuado ambiente uterino y agentes infecciosos podrían ser las causas principales.

Aunque no se conoce la causa exacta de las altas pérdidas embrionarias en estas especies, la insuficiencia luteal y la endometritis subclínica podrían estar involucradas. El diagnóstico se basa en un buen registro de empadres y en el diagnóstico de preñez temprano. Las pérdidas embrionarias precoces (<14 días) podrían no ser detectadas mediante ultrasonografía, y se podrían manifestar sólo con un retraso en el retorno de la receptividad sexual. No obstante, es muy difícil detectar pérdidas embrionarias ocasionadas por insuficiencia luteal. Las determinaciones de progesterona séricas serían de gran ayuda para determinar un buen establecimiento de la función del cuerpo lúteo (Sumar y Adams, 1997).

Un estudio en alpacas se reportó a la metritis como un problema sanitario que puede ocasionar bajas tasa de preñez en un 10 – 30 % (Ludeña, 1979). En relación a la ello una buena terapia uterina debe ser establecida (Sumar y Adams, 1997). En llamas las infecciones específicas en los órganos reproductores, no han sido aún identificados como causas de alta mortalidad embrionaria (Fernández – Baca, 1971; Sumar y Adams, 1997).

Se ha relacionado el estadio del folículo dominante en el momento de la ovulación con las tasas de mortalidad embrionaria posteriores en alpacas. Sumar (1997) planteó que si la cópula se produce en el estadio de crecimiento o regresión folicular; se producirá ovulación y fecundación; pero el CL no prosperaría más adelante, quizás por la menor secreción de LH liberada provocando la mortalidad embrionaria temprana. Asimismo, Cervantes (2004) a pesar de que no encontró diferencias significativas en las tasas de mortalidad embrionaria en alpacas empadradas durante la fase de crecimiento, maduración y regresión folicular, hubo una diferencia numérica que sugiere posible significancia si se utilizaran mayor número de animales.

Se ha sugerido también que las alpacas receptivas con previa presencia de CL, responden con eficiencia a la inducción de la ovulación y al establecimiento de la fertilización y gestación; debido probablemente a una previa sensibilización de la P_4 endógena sobre el eje hipotálamo-hipófisis, que resultaría en una mejor respuesta de secreción de hormonas gonadotrópicas sobre el establecimiento y desarrollo del CL de la preñez (Leyva y García, 2000).

El descenso de los niveles de P_4 que sucede entre los días 8 y 11 de la preñez de alpacas, coincide con el inicio de la inducción uterina para la regresión del CL en hembras vacías y también con el momento del reconocimiento maternal de la preñez; el cual estaría relacionado con la mortalidad embrionaria (Sumar, 2000).

En llamas se ha demostrado que hay un mayor porcentaje de embriones gestando en el cuerno uterino izquierdo; aún teniendo un cuerpo lúteo en el ovario derecho, lo que demuestra que el cuerno uterino izquierdo ofrece condiciones más favorables para la sobrevivencia del embrión (Sumar y Leyva, 1979).

En otro estudio realizado por Fernández – Baca *et al.* (1979) evidenciaron que la actividad luteolítica del cuerno uterino derecho tiene acción local mientras que el izquierdo tiene efecto tanto local como sistémico, es decir actúa también sobre el ovario derecho lo que

indicaría que el embrión procedente del ovario derecho debe migrar al izquierdo para sobrevivir. Esta hipótesis es corroborada anatómicamente, ya que una vena cruza el cuerno uterino izquierdo hacia el derecho, ejerciendo control luteolítico a través de una ruta veno arterial (Del Campo *et al.*, 1996). No obstante, si se recesiona el cuerno uterino y ovario izquierdo, la gestación es viable en el cuerno derecho (Fernández – Baca *et al.*, 1975).

Se ha establecido una relación entre el número de cópulas y fallas de fertilidad, hallándose que en alpacas que recibieron una sola cópula la tasa de fertilización y natalidad fue menor (Sumar *et al.*, 1987). Sumar y Alarcón (1989), corroboraron estos resultados al obtener mayores tasa de natalidad luego de dos servicios el mismo día con intervalos de 6 – 8 horas. Además, Aparicio (2001) obtuvo mayor sobrevivencia embrionaria en cópulas adicionales en los días 4 y 5 en alpacas.

2.7.7 Gestación media, avanzada y parto

La preñez dura aproximadamente 345 días, generalmente resulta en el nacimiento de una sola cría (San Martín *et al.*, 1968; Sumar, 1988; Sumar, 2000). El cuerpo lúteo juega un rol fundamental a lo largo de la preñez (Fernández-Baca, *et al.*, 1970; Sumar *et al.*, 1988) y en la placenta como en otros camélidos, no presenta la disposición cotiledón/caruncular encontrada en rumiantes, siendo de tipo difusa y epiteliocorial (Steven *et al.*, 1980, Sumar *et al.*, 1988; Fowler y Olander, 1990). La migración temprana de los embriones del cuerno uterino derecho al izquierdo y el desarrollo de la implantación y preñez en este cuerno en particular es usual (Adams *et al.*, 1989b).

Durante el desarrollo fetal en alpacas se observa que el útero grávido se encuentra dentro de la cavidad pélvica hasta el día 90; luego se localiza craneal al borde de la cavidad (Bravo y Valera, 1993).

En llamas las concentraciones de P_4 plasmáticas permanecieron elevadas (6.36 Nmol/L) durante toda la preñez y declinaron dos semanas antes del parto, disminuyendo a niveles basales (1.59 Nmol/L) a las 24 horas previas al parto (León *et al.*, 1990). En alpacas se han encontrado resultados similares, hallándose una disminución marcada de P_4 a las 72 horas post parto.

Respecto a los niveles de estradiol 17β se ha reportado que permanecen bajos por 9 meses, para después aumentar y alcanzar un pico (1.96 ± 10 pg/ml) la última semana de preñez;

pero vuelve a descender hasta niveles basales (0.25 ± 0.5 pg/ml) en la primera semana después del parto (León *et al.*; 1990). Las concentraciones más altas de 15 – ketodihydro – PGF2 α en llamas y alpacas (159 ± 35 Nmol /L y 92 ± 29 Nmol/L respectivamente) han sido detectadas en el día del parto, pero disminuyen hasta concentraciones basales al día 3 post parto (Aba *et al.*, 1998).

Estudios han demostrado que el tiempo de parición en alpacas se encuentra bajo el control del fotoperíodo (Knight *et al.*, 1995). Es así, que el parto ocurre mayormente en las mañanas a partir de las 5:00 hasta las 14:30 horas, siendo las 9:00 horas donde se produce el mayor número de partos (Novoa, 1992; Palomino *et al.*, 1987). La duración del parto normal en llamas es de 1:22 horas y 1:53 horas en multíparas y primíparas, respectivamente (Palomino *et al.*, 1987).

2.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ EN LLAMAS Y ALPACAS

El diagnóstico de preñez en llamas y alpacas puede ser realizado de manera directa o indirecta. Los métodos indirectos involucran la prueba de receptividad sexual utilizando un macho, o la medida de las concentraciones de progesterona en sangre y leche. El objetivo de estos métodos indirectos es diferenciar entre las fases folicular y luteal del ciclo ovárico. Entre los métodos directos están la palpación, el baloteo y la ultrasonografía del conceptus. (Adams y Domínguez, 2007).

2.8.1. Comportamiento sexual y niveles de progesterona

Es conveniente asociar el comportamiento sexual a las concentraciones sistémicas de progesterona como indicadores de preñez en llamas y alpacas, ya que existe una relación inversa entre los niveles de esta hormona y la receptividad sexual de la hembra. (Adams *et al.*, 1989b; Bravo *et al.*, 1991; Fernández –Baca *et al.*, 1970c; San Martín *et al.*, 1968).

En llamas preñadas existe una disminución de los niveles de progesterona plasmática entre los días 9 y 11 después de la monta, así también hay un decrecimiento del diámetro luteal. Esta caída de progesterona coincide con el inicio de la regresión luteal en no preñadas, y se ha sugerido que la recuperación del CL entre estos días se daría como una respuesta luteal a la preñez (Reconocimiento maternal de la preñez) (Adams *et al.*, 1991).

Los niveles de progesterona en promedio difieren entre hembras vacías y preñadas. Un estudio reportó que la progesterona no excedió los 0,4 ng/ml en llamas que no fueron montadas ni ovularon, pero en llamas preñadas estos niveles excedieron los 2 ng/ml después del día 11 post monta. En el mismo estudio se encontró una alta correlación entre las concentraciones de progesterona plasmática y el diámetro del CL (Adams *et al.*, 1991).

Otro estudio realizado por Sumar (1971) revela la asociación entre los niveles de progesterona en sangre y leche en hembras vacías y preñadas 14 días post –monta. Por los estudios realizados se puede decir que el diagnóstico en hembras no preñadas podría realizarse a partir del día 11 después de la monta utilizando la prueba de receptividad sexual o determinando las concentraciones de progesterona y una regresión del CL (Adams y Domínguez, 2007).

Estas dos pruebas podrían ser más apropiadas para el diagnóstico de la **no preñez**, debido a que la función del cuerpo lúteo puede ser también provocada por factores diferentes de la preñez. La ovulación espontánea (en 10% de hembras no montadas) es uno de ellos, si ocurre éste podría dar un diagnóstico de falso positivo a la preñez. Procesos patológicos tales como el quiste luteal, pérdida embrionaria / fetal podrían prolongar la fase luteal y dar un diagnóstico falso positivo de preñez. (Fernández – Baca *et al.*, 1970; Adams *et al.*, 1990; England *et al.*, 1969).

En un estudio se determinó que la proporción de diagnósticos correctos a la prueba de receptividad fue de 84% y 95% en llamas y alpacas respectivamente entre los 70 y 125 días de gestación. Aunque esta prueba es útil, su inconveniente es la subjetividad, sobre todo cuando hay hembras sumisas y machos dominantes que podrían hacer que la hembra adopte la posición de cópula sin que esta esté realmente receptiva (Adams y Domínguez, 2007).

2.8.2. Palpación y Baloteo

Con experiencia la palpación transrectal puede ser utilizada para la detección de preñez al día 35 post monta, basado en la marcada asimetría de los cuernos uterinos (el conceptus se aloja en el cuerno uterino izquierdo), fluctuación del fluido y en las partes fetales en estadíos más avanzados (Alarcón *et al.*, 1990)

Respecto al baloteo transabdominal no se han encontrado reportes específicos, no obstante, algunos ganaderos tienen una gran habilidad utilizando esta técnica sobretodo después de los 8 meses de gestación (Adams y Domínguez, 2007).

2.8.3 Diagnóstico de preñez por ultrasonografía

La ultrasonografía es una técnica útil para determinar el estado reproductivo de las hembras (Bourke *et al.*, 1992a); destacando su utilidad para el diagnóstico temprano de preñez. La ultrasonografía tiene ventajas frente a otras técnicas, por ser una técnica no invasiva y relativamente económica en comparación con los métodos hormonales.

Se han usado dos modalidades para el diagnóstico de preñez, el A- mode (Modalidad amplitud) y B-mode (Modalidad de brillo).

En caso del A-mode se utiliza para realizar ecografías transabdominal, mientras que con el B-mode se pueden realizar ecografías transrectales. En el primer caso es útil para el diagnóstico de preñez después del día 60- post monta. En el caso de la ecografía transrectal en cambio se puede diagnosticar preñez mucho antes, debido a que el transductor es introducido a través del recto, lo que permite una mejor imagen comparada a la ecografía transabdominal. (Adams y Domínguez, 2007).

Evaluaciones seriadas revelan que la vesícula embrionaria podría ser detectada en cualquier segmento tanto del cuerno uterino ipsilateral o del contralateral al lugar de la ovulación. Sin embargo, después del día 20 el embrión debe fijarse en un lugar, que es con frecuencia la porción media del cuerno uterino izquierdo, donde el desarrollo continua (Adams y Domínguez, 2007). Después del día 26 de preñez, el embrión / feto en desarrollo fue observado en el cuerno uterino izquierdo.

La vesícula embrionaria fue primero detectada como una reunión irregular de fluido tan temprano como a los 12 días después de la primera monta (2 a 4 mm de diámetro), y el latido cardiaco del embrión fue detectado por el día 26 después de la monta. En un estudio de ultrasonido de 19 alpacas, la vesícula embrionaria fue detectada primero en un 30% de preñeces al día 10 post-monta, en un 50% al día 15, y en un 100% al día 23 (Parraguez *et al.*, 1997). En otro estudio ultrasonográfico de 40 alpacas, la vesícula embrionaria se detectó en un 50% de preñeces al día 12 post-monta, en un 83% al día 14 y en un 100% al día 15 (Bravo *et al.*, 2000).

Por tanto, el tiempo razonable para iniciar el diagnóstico de preñez, es alrededor del día 16 después de la monta, dependiendo de las condiciones de la examinación y la experiencia del operador (Adams y Domínguez, 2007). Un estudio determinó que un 11% de llamas diagnosticadas como preñadas mediante ultrasonografía al día 20 o antes; pierden el conceptus alrededor del día 40 después de la monta, y posteriores pérdidas no se registraron sino hasta el día 60, por tanto, parecería razonable monitorear el desarrollo del conceptus más frecuentemente durante la preñez temprana (Día 25, 40 y 60) y menos frecuentemente de aquí en adelante (a los 3, 6 y 9 meses, hasta el término).

2.9. Sincronización y Superestimulación ovárica en Camélidos Sudamericanos

Los camélidos sudamericanos al ser ovuladores inducidos, en ausencia de un estímulo ovulatorio, la dinámica folicular se lleva a cabo en sucesivas ondas de crecimiento folicular, maduración y regresión.

Entre uno de los objetivos de sincronizar la dinámica folicular es empezar tratamientos superestimuladores ováricos en el inicio de la onda folicular en ausencia de los folículos dominantes. También es empleado para sincronizar las hembras donadoras y receptoras en un programa de transferencia de embriones (Miragaya *et al.*, 2006).

2.9.1 Sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular

En llamas, la progesterona exógena en la fase luteal o en la preñez ha demostrado que inhibe el crecimiento folicular, reduce el tamaño del folículo dominante y acorta la duración de la onda folicular (Adams *et al.*, 1990). Varios autores han investigado la posibilidad de sincronizar y producir el desarrollo del siguiente folículo dominante mediante la estimulación de la fase luteal utilizando progesterona/progestágenos exógenos sólo en combinación con estrógenos (Ratto *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de esponjas conteniendo diferentes dosis de Acetato de Medroxiprogesterona (MAP), no produjo sincronización del crecimiento folicular (Ferrer *et al.*, 1999, citado por Miragaya *et al.*, 2006). La razón para el empleo de progesterona para sincronizar el desarrollo folicular en llamas, no está muy clara, ya que la presencia de fases luteales regulares no es una característica en el patrón ovárico en camélidos (Adams *et al.*, 1990).

Existen otros métodos alternativos para permitir la emergencia de una nueva onda folicular mediante la ovulación del folículo dominante. La monta con un macho vasectomizado, o la inyección de GnRH, LH o gonadotropina coriónica humana (hCG) exógena, en presencia de un folículo en crecimiento o maduro de 7 mm o mayor en diámetro, han inducido ovulación en un período de 28 a 30 hrs. La Buserelina análogo de GnRH, ha sido administrada en dosis de 8 µg durante varios años en llamas y alpacas. Más adelante la LH se empezó a utilizar intramuscularmente en llamas, en concentraciones de 2 mg.

Ratto (2005) obtuvo en llamas tasas de ovulación de 91% y 80 % para LH y GnRH, respectivamente. La dosis de hCG para inducir ovulación está entre 500 y 750 UI, administradas intramuscularmente. Sin embargo, se ha reportado la formación de anticuerpos en respuesta al uso repetido de hCG en vacas, lo que podría haber ocasionado el incremento de mayores dosis de hCG para inducir ovulación en llamas.

En el estudio reportado por Ratto *et al.* (2003), se observó la emergencia de una nueva onda folicular inmediatamente después de la ovulación, a los 1.9 ± 0.4 días después de inducir ovulación con LH (5 mg), mientras que utilizando 1 mg de estradiol-17β y 25 mg de progesterona la emergencia de la nueva onda demoró 4.02 ± 0.6 días. Otro estudio no registró diferencias en el máximo tamaño del CL luego de la monta natural, o la aplicación de LH y GnRH; concluyendo que ambas hormonas son confiables para inducir ovulación y función luteal normal, muy semejante como sucede luego de la monta natural (Ratto, 2005).

Luego de la sincronización un subsecuente tratamiento con prostaglandina podría ser necesario para inducir la luteólisis, si el momento de la monta se lleve a cabo antes de las 2 semanas, considerando que la luteólisis natural varía entre 8 a 13 días en alpacas y llamas (Bourke *et al.*, 1992).

La supresión de todos los folículos mayores de 5 mm utilizando la aspiración folicular guiada por ultrasonido ha sido empleada también para sincronizar la onda folicular. Esta técnica permite la eliminación del folículo dominante y la supresión de su efecto negativo sobre el crecimiento folicular; permitiendo la emergencia de una nueva onda en 5.0 ± 0.5 días (Ratto *et al.*, 2003). La desventaja es que es una técnica invasiva, y puede producir hemorragias y es difícil aplicarla en condiciones de campo.

Estos trabajos nos llevan a pensar que el empleo de las gonadotropinas LH y GnRH sería una buena alternativa para inducir la emergencia de una nueva onda folicular.

2.9.2 Superestimulación

La superestimulación ovárica consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos simultáneamente. Para obtener superestimulación es necesario empezar el tratamiento hormonal en ausencia de folículos mayores de 6-7 mm (Folículo dominante) (Monniac *et al.*, 1983).

Los tratamientos superestimulatorios mayormente empleados consisten en la administración de hormonas (gonadotropina coriónica equina (eCG) o hormona folículo estimulante porcina (FSH)) luego de la sincronización de la onda folicular utilizando la fase luteal natural (induciendo la ovulación) o la fase luteal artificial (progesterona exógena).

En alpacas la respuesta a la superovulación no ha sido muy exitosa utilizando tanto esquemas con progestágenos como con gonadotropinas; obteniéndose una muy baja cantidad de embriones. Sin embargo, un reciente estudio ha reportado la obtención de 8.7 ± 2.1 CL y 4.3 embriones en promedio, luego de superestimar a alpacas con 650 UI de eCG, y realizar el lavado uterino 6 días post monta (Cervantes, 2008).

Se ha obtenido mejor respuesta ovárica en llamas, obteniéndose diferentes número de embriones (Palasz *et al.*, 2000; Huanca *et al.*, 2004; Huanca, 2005a; Huanca, 2005b). Y los tratamientos con FSH y eCG administrados durante la emergencia de la onda folicular resultaron efectivos para la superovulación ovárica (Ratto, 2005).

La respuesta ovulatoria observada en el número de ovulaciones o cuerpos lúteos (CL) varía ampliamente entre los estudios, con un rango entre 2 a más de 11 por animal. Muchas de las la variación podría atribuirse a la variación en el estado folicular en el momento en que es iniciado el tratamiento superestimulatorio (Ratto, y Adams, 2007). Se ha observado también que el incremento de las dosis de gonadotropinas resulta en una respuesta ovárica más alta, pero el número de embriones recuperados es menor o no varía, sugiriéndose una interferencia con el transporte de gametos por altas dosis de gonadotropinas (Miragaya *et al.*, 2006).

2.10 Colección y Transferencia de embriones

Se han colectado embriones varios días después del empadre utilizando las técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas en alpacas y guanacos no estimulados y en alpacas y llamas superestimulados. El lavado uterino se ha realizado desde el día 6.5 al 12 después de la monta, pero la recuperación de embriones ha sido frustrantemente variable. Generalmente se han recuperado menos del 50% de cigotos, en base al número de CL, indistintamente al método de colección (Del Campo *et al.*, 1995).

2.10.1 Morfología embrionaria

Los embriones colectados de hembras superovuladas 6 a 7 días después de la monta varía en tamaño desde 0.1 mm a 1 mm, y usualmente se les encuentra en estadio de blastocisto expandido liberado. El diámetro promedio de un total de 163 embriones de llama y 19 embriones de alpaca, fue de $527.1 \pm 168.0 \mu\text{m}$ y $534 \pm 151.4 \mu\text{m}$, respectivamente. La expansión del trofoblasto se extiende desde un promedio de 1.2 mm en diámetro en el día 6.5 a 7.5, hasta 83 mm de longitud al día 13 a 14. Esta tasa acelerada de desarrollo embrionario podría estar relacionada al aparentemente temprano reconocimiento maternal de la preñez en estas especies (Adams *et al.*, 1991).

2.11. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

El empleo de embriones congelados permite utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta tener receptoras disponibles en el momento apropiado; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas; crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras (Celestinos y Gatica, 2002).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196°C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc; es decir, se reduce drásticamente la actividad fisiológica de la célula. De esta manera es posible almacenar embriones durante un

largo período sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (Tanaka *et al.*; 1997). Por todo ello la criopreservación permite crear bancos de embriones con caracteres genéticos deseados para ser utilizados en un tiempo y lugar determinado. Y ha llegado a ser un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina (Palomino y Li, 2000).

2.11.1 Principio básico de la criobiología

Para sobrevivir a la criopreservación las células deben permanecer sin daño y fisiológicamente funcionales durante todo el proceso (Bo *et al.*, 2003). Cuando los embriones van a ser congelados, primero son suspendidos y equilibrados en una solución conteniendo agentes crioprotectores (ACP) (Leibo, 2008). Estos crioprotectores son de bajo peso molecular y previenen la deshidratación y degeneración de proteínas causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso (Kanagawa, 1995).

Las diferencias en las dimensiones moleculares de los ACP, tanto como las propiedades de las membranas celulares hacen que estos compuestos tengan diferentes tasas de permeabilidad hacia las células. Estas diferencias se expresan en coeficientes de permeabilidad. Además, los diferentes estadios de desarrollo embrionario, desde oocitos hasta cigoto, varían en el grado de permeabilidad para un mismo ACP. Finalmente los embriones u oocitos de diferentes especies, aun siendo del mismo estadio de desarrollo embrionario, también exhiben diferencias en la permeabilidad al mismo ACP (Leibo, 2008).

La pérdida de agua de la célula cuando es expuesta a una solución hipertónica depende de la permeabilidad al agua de la célula, la cual es una característica fundamental de cada célula dependiendo de la composición de la membrana celular y la superficie del área celular (μm^2). La permeabilidad de la célula al agua, frecuentemente se refiere a su conductividad hidráulica (dada en unidades de $\mu\text{m}/\text{min atm}$), también depende de la temperatura de exposición, y de la proporción de la presión del vapor interno y externo, que es la diferencia en la presión osmótica de la solución dentro y fuera de la célula. (Leibo, 2008).

La variable tiempo es un importante factor, ya que las células podrían ser enfriados a diferentes tasas de enfriamiento, “lenta”, “moderada”, “rápida” y aún “ultrarápida”. Esta tasa de enfriamiento ejerce un profundo efecto en la manera como se forma y crecen los cristales de hielo. En tasas de enfriamiento lento, el hielo crece lentamente en grandes cristales, secuestrando los solutos disueltos en canales entre cristales de hielo. En tasas de enfriamiento

mas elevadas, el hielo crece más rápidamente tal que los cristales son mucho más pequeños, sin embargo, los solutos están aún concentrados en canales (Leibo, 2008).

2.11.2 Crioprotectores y soluciones para congelación

Los crioprotectores son químicos adicionales utilizados en las soluciones de criopreservación para evitar la formación de hielo y los efectos del shock osmótico. Los crioprotectores pueden ser clasificados en dos categorías:

a) Crioprotectores permeables, son pequeñas moléculas, de bajo peso molecular (PM) que rápidamente penetran las membranas de las células forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua intracelular y disminuyen la temperatura de congelación de la mezcla resultante, previniendo la cristalización de hielo (Pereira y Marques, 2008). Este tipo de crioprotectores actúan deshidratando el agua libre intracelular mediante la diferencia de presión osmótica y también ingresa a las células para proteger el citoplasma (Kanagawa, 1995). Entre los crioprotectores permeables más utilizados destacan: metanol (PM=32,04), etilenglicol (EG) (PM=62,07), 1,2 propanediol (PM=76,10), Dimetil sulfóxido (DMSO) (PM=78,13), 2,3 butanediol (PM=90,12), glicerol (G) (PM=92,10), entre otros (Bo *et al.*, 2003).

Para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, debido a la alta concentración de sales, se ha demostrado que el uso de EG, sólo o en combinación con sucrosa o trealosa han demostrado ser menos tóxico que utilizar G y DMSO (Dochi *et al.*, 1990). Dado su bajo peso molecular, el EG tendría una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposición disminuyendo su efecto tóxico (Saha *et al.*, 1996).

b) Crioprotectores no permeables, también actúan deshidratando el agua libre intracelular por la diferencia de presión osmótica, pero no ingresan a las células quedando en el extracelular, extrayendo agua libre de la célula y causando deshidratación del espacio intracelular (Kanagawa, 1995). Estos crioprotectores se usan en combinación con un crioprotector permeable, para incrementar la concentración neta del crioprotector permeable dentro de la célula y prevenir también la formación de cristales de hielo (Pereira y Marques, 2008). Dentro de los crioprotectores no permeables se encuentran los de bajo y alto peso molecular. Entre los de bajo PM tenemos: galactosa (PM=180,20), glucosa (PM=181,10), sacarosa (PM=342,30), tetralosa (PM=378,30), y otros azúcares. Y en el grupo de los de alto PM (>50.000 Daltons)

están: polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, almidón hidroxietílico, hialuronidato de sodio y otros polímeros (Bo *et al.*, 2003).

Los protocolos de congelación y descongelación comúnmente usan altas concentraciones de crioprotectores no permeables durante la fase de descongelación (Jain y Paulson, 2006). El crioprotector no permeable comúnmente utilizado es la sucrosa, pero pueden utilizarse también otros disacáridos, tales como la galactosa y trealosa y otros agentes no permeables, tales como las macromoléculas y los agentes relajantes del citoesqueleto celular (Pereira y Marques, 2008).

Las macromoléculas y los polímeros de alto peso molecular se usan frecuentemente como un crioprotector extracelular y aunque estos no penetran la membrana celular, ellos pueden reducir la cantidad de crioprotector intracelular necesario para la vitrificación, reduciendo la toxicidad de la solución. Se sabe también que los polímeros protegen contra la ruptura de la zona pelúcida. Actualmente, la mayoría de soluciones utilizadas para la vitrificación contienen Suero Fetal Bovino (SFB) como un componente macromolecular (Pereira y Marques, 2008).

Los agentes estabilizadores del citoesqueleto durante la vitrificación pueden ser utilizados también para mejorar la sobrevivencia y desarrollo subsecuente de oocitos o embriones vitrificados. El principal daño observado durante la vitrificación es una configuración del huso anormal debido principalmente a la desorganización o desensamblaje de los microtubulos meióticos. La Citocalasin B (CCB) es considerada un relajante del citoesqueleto que hace menos rígido a los elementos del citoesqueleto

2.11.3 Métodos de criopreservación

Actualmente, existen dos métodos para la criopreservación de gametos y embriones: La congelación lenta y la vitrificación (Cuadro 1). La **congelación lenta** tiene la ventaja de usar concentraciones bajas de crioprotectores, disminuyendo la probabilidad que se produzca toxicidad química y shock osmótico, pero su habilidad para prevenir la formación de cristales de hielo es limitada debido a las bajas concentraciones de crioprotectores que son utilizadas. En el método de **vitrificación**, las altas concentraciones de crioprotectores inhiben la formación de cristales de hielo y produce el desarrollo de un sólido similar al vidrio, llamado estado de vitrificación en el cual el agua se solidifica. Sin embargo, la toxicidad a estas concentraciones es

tal que la célula sólo puede ser expuesta a la solución crioprotectora durante un corto período de tiempo y/o un volumen mínimo de la solución (Arav *et al.*, 2002). A pesar que la congelación lenta continúa siendo la técnica ampliamente utilizada para embriones producidos *in Vivo* e *in Vitro*, en las últimas décadas la vitrificación ha sido probada en diferentes especies con buenos resultados (Berthelot *et al.*, 2000; Vajta *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2006); sin embargo no se ha utilizado masivamente debido a la falta de estandarización de los protocolos (Celestinos y Gatica, 2002).

Cuadro 1 Métodos de criopreservación de embriones

Procedimiento de Criopreservación	
Método de congelación lenta convencional	Vitrificación
1.- Pajillas standards de 0.25 ml	1.. Diversos dispositivos para cargar los embriones (pajillas convencionales, OPS, cryoloop, etc)
2.- Concentración de crioprotectores baja	2.- Concentraciones de crioprotectores alta/ volumen y el tiempo se reducen en la solución de vitrificación
3.- Seeding a -5°C a -7°C , enfriamiento lento y controlado (0.1 a $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	3.- Tasa de enfriamiento ultrarrápido ($-2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ o $20000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ usando OPS o Cryoloop)
4.- Sumergimiento a los -30°C a -70°C y almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C)	4.- Sumergimiento en nitrógeno líquido (-196°C)

Pereira, R.; Marques, C. 2008

2.11.3.1 Congelación lenta

Este método de congelación permitió obtener la primera criopreservación exitosa de embriones de ratón reportada por Whittingham *et al.* (1972). Un año más tarde, en 1973, Wilmut y Rowson, obtuvieron el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado por este mismo método (Bo *et al.*, 2003). Desde entonces el método ha sufrido distintas modificaciones tendientes a su simplificación.

Para realizar La congelación lenta, las pajillas conteniendo los embriones son enfriadas empleando un equipo de congelación programable, el cual puede utilizar como agente refrigerante nitrógeno líquido (NL), alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor (Bilton's, 1980, citado en Kanagawa, 1995). Este método utiliza crioprotectores permeables y tasas de congelación lenta y de descongelado relativamente rápidas. Los procedimientos convencionales de congelado lento incluyen los siguientes pasos (Bo *et al.*, 2003):

- 1) Exposición de los embriones a temperatura ambiente (22°C) a concentraciones de un crioprotector permeable de bajo peso molecular como el etilenglicol o el glicerol, hasta que se alcanza el equilibrio entre la solución crioprotectora y el embrión.
- 2) Inducción de la formación de cristales de hielo (“seeding”) entre -5 y -7°C.
- 3) Descenso lento y controlado de la temperatura (0,3 a 0,1 °C/min) hasta los -30°C ó -35°C.
- 4) Colocación en nitrógeno líquido (N₂; -196°C) donde puede permanecer almacenado indefinidamente.
- 5) Descongelación controlada alrededor de 250°C/min (ej. Baño maría a 25°C).
- 6) Remoción del crioprotector a temperatura ambiente.
- 7) Transferencia del embrión a una receptora.

Cuando el embrión se expone a crioprotectores inicialmente se encoge por la pérdida de agua a causa de la hiperosmolaridad de la solución extracelular. El encogimiento continuará hasta que el flujo de agua es balanceado por el flujo de ingreso del crioprotector. El crioprotector entrará luego a las células embrionarias a una velocidad que dependerá del coeficiente de permeabilidad y la temperatura. De esta forma, el embrión aumentará nuevamente de tamaño, y cuando la concentración de solutos fuera y dentro de la célula llegue a un equilibrio (aproximadamente 10 minutos a 22°C para el glicerol y menos de 5 para el etilenglicol) alcanzarán su volumen original (Bo *et al.*, 2003, Kanagawa, 1995).

Los crioprotectores comúnmente utilizados en esta técnica son el glicerol y el etilenglicol, a una concentración de 1,5 M. Esta concentración hace que el punto de congelación del medio disminuya a comparación del agua que congela a 0°C, es decir que la formación del núcleo de congelación se inicia a una temperatura más baja. A este fenómeno se le conoce como superenfriamiento (en inglés “supercooling”) lo provoca el calor latente de fusión, que es una elevación repentina de la temperatura (de 10 a 15 °C), resultando en un severo shock físico, el cual podría dañar a las células.

En la congelación de semen, se obtienen buenas tasas de sobrevivencia sin inducir la formación de hielo, sin embargo, los embriones tienen un gran número de células con alto contenido de humedad, además de poseer una membrana especial (zona pelúcida). Por ello, es necesaria la inducción de la formación de cristales de hielo, conocido como “seeding” (Bo *et al.*, 2003, Kanagawa, 1995).

El punto de congelación de los crioprotectores se da entre los -2 a -3 °C, pero a esta temperatura aún no se inicia la congelación, debiéndose inducir la formación de hielo 2°C por debajo de esta temperatura.

La mayoría de protocolos de congelación lenta recomiendan se realice el seeding a los -7°C, previniendo el superenfriamiento y los efectos negativos del congelamiento rápido que ocurre cuando se producen espontáneamente los núcleos de hielo (Duman, 1982, citado por Bo *et al.*, 2003). Algunos equipos de congelación inducen el seeding automáticamente (Kanagawa, 1995).

Con un mayor descenso de temperatura durante el proceso de congelación aumentan los cristales de hielo, se incrementa la concentración de solutos y los embriones responden osmóticamente perdiendo agua al medio extracelular aun no congelado.

Contrariamente a lo que ocurre en la congelación, la descongelación de los embriones debe realizarse rápidamente (aproximadamente a 250°C/min) para evitar la recristalización (Mazur *et al.*, 1972, citado por Bo *et al.*, 2003).

Para la descongelación las pajuelas que contienen los embriones son colocados en agua tibia, a una temperatura de 20 a 35 °C por 15 a 30 seg. aproximadamente. También se ha reportado una menor incidencia de zonas pelúcidas lesionadas si se mantienen a los embriones en el aire a temperatura ambiente por 10 segundos antes de colocarlos en el agua tibia (Mapletoft y Palasz, 1994, citado por Bo *et al.*, 2003).

Luego de la descongelación se debe extraer el crioprotector del interior de las células embrionarias, para lo cual se pueden utilizar 2 métodos. El primero consiste en colocar el embrión en una solución concentrada de un crioprotector no permeable, durante 5 a 10 minutos al entrar en contacto con la célula, el crioprotector no permeable actúa como una fuerza osmótica, provocando la salida del crioprotector permeable desde dentro de las células hacia el medio.

De esta manera el embrión se contrae, perdiendo volumen. Luego los embriones pasan al medio de mantenimiento, en donde ingresa agua por osmosis, con lo que el embrión vuelve a su tamaño original.

2.11.3.2 Vitricación

La vitricación es un procedimiento físico, que consiste en el tránsito de los medios en estado líquido a una condición de vitricado y amorfo, sin que medie la formación de cristales de hielo. La solidificación es ocasionada por la extrema alza de la viscosidad del medio durante el enfriamiento (Scheffen *et al.*, 1986). Esta técnica difiere de los procesos clásicos de congelación de embriones por la omisión de los períodos lentos de congelación, no siendo necesario inducir la cristalización “seeding”, ni el control del descenso de la temperatura (Lieman, 1991)

Durante el proceso de vitricación, el embrión esta sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el descongelamiento. Esto se debe a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se han congelado (Celestinos y Gática, 2002).

Este choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión (Schneider y Mazur, 1984), debido a la pérdida del equilibrio entre las soluciones intra y extracelulares, y a las respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos. Las altas tasas de enfriamiento (aproximadamente 2500°C/ min) utilizadas para lograr la vitricación, necesita de elevadas concentraciones de crioprotectores permeables, los que pueden ser tóxicos para las células.

- Factores a tener en cuenta para reducir daños durante la vitricación

Para obtener buenos resultados al utilizar el método de vitricación se debe tener en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición del crioprotector, temperatura y tiempo de equilibrio, tasa de enfriamiento. Todos estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Celestinos y Gatica, 2002).

En el caso de las altas concentraciones de crioprotectores, se ha comprobado que la exposición de los embriones a los crioprotectores en dos pasos (Kasai *et al.*, 1996) o a bajas temperaturas (Rall y Fahy, 1985a) puede minimizar los efectos tóxicos. También es importante disminuir los tiempos de exposición a los crioprotectores y la adición de sustancias como la sacarosa, tetralosa, sucrosa, crioprotectores no permeables (Boutron y Peyridieu, 1994) que pueden disminuir la toxicidad del medio de vitrificación.

Por lo tanto, el presente desafío es encontrar solutos o mezclas de solutos que puedan crear una solución vitrificable que no sea tóxica para las células cuando se equilibren con el material biológico.

- Dispositivos utilizados en vitrificación

La vitrificación puede lograrse con una concentración de 1,5 M de cualquier crioprotector, mientras que la tasa de enfriamiento empleada sea mayor a 150 °C/min. Es necesario entonces aumentar la velocidad de congelación (sumergir la muestra rápidamente dentro de nitrógeno líquido) y disminuir el volumen de la solución vitrificante que rodea al embrión. Por ello se han empleado diferentes dispositivos, tales como: electrón microscopio (Martino *et al.*, 1996), open pulled straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), cryoloops (Fuchinoue *et al.*, 2004), cryotops and cryotips (Kuwayama *et al.*, 2005)

2.11.3.3 Procedimientos para la criopreservación de embriones

Desde finales de los setentas e inicios de los ochenta, se han hecho muchos reportes en almacenamiento de embriones mediante congelación, pero la aplicación del método es hasta la actualidad complicada. Además la tasa de preñez obtenida con este método es menor que la utilizada en embriones frescos: El promedio de tasa de preñez a nivel mundial empleando embriones congelados y descongelados es alrededor del 30%. Sin embargo, se espera que el procedimiento se haga más simple y que la tasa de preñez se incremente (Kanagawa, 1995). El procedimiento de la congelación lenta se resume a continuación:

a) **Selección y preparación de embriones**

Estos procedimientos se inician inmediatamente después de la recolección, con la selección de embriones de calidad buena, de acuerdo a sus características morfológicas. Posteriormente los embriones son sometidos a varios lavados en medio bufer, enriquecida con suero fetal bovino. Dichos lavados se realizan con la finalidad de limpiar la superficie de los embriones del moco uterino y protegerlo contra la contaminación bacteriana (Palomino y Li, 2000).

b) **Adición de crioprotectores**

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesione las estructuras citoplasmáticas (Celestinos y Gatica, 2002). Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación.

Varios procedimientos de adición de crioprotectores se basan en el método de adición de crioprotectores en diferentes concentraciones (de menor a mayor concentración) en una solución buffer; en donde los embriones permanecen durante un tiempo a una temperatura constante. Luego los embriones son enfriados y congelados.

La sobrevivencia del embrión está muy asociado a la concentración del crioprotector que será adiciona, al método de adición de éstos, la temperatura en la cual son adicionados y El tiempo de equilibración. En la actualidad, sin embargo, no se ha establecido un procedimiento de adición de los crioprotectores (Kanagawa, 1995).

c) **Colocación de embriones en pajilla**

Luego de la adición de los crioprotectores, los embriones son envasados individualmente en pajillas de cloruro de polivinílico de 0.25 o 0.50 ml. de capacidad. Para este efecto se procede de la siguiente manera: la pajilla es cargada aspirando una columna de la solución, una burbuja de aire después, se sigue con una columna de medio conjuntamente con el embrión, otra burbuja de aire y finalmente se completa con el medio; se tiene cuidado que la primera columna toque el tapón de la pajilla, como es de algodón y alcohol polivinílico

se solidificará con el líquido, de esa manera se hará impermeable (Palomino y Li, 2000). Una vez colocados los embriones en pajillas, son identificados, para iniciarse el proceso de congelación, el cual se realiza con la ayuda de equipos especializados para tal fin.

d) Dispositivos de enfriamiento y congelación

Actualmente la mayoría de equipos que controlan eficazmente la temperatura de enfriamiento y congelación, utilizando un software de computadora. Debido a ello El control de la temperatura puede ser programada, y la congelación de embriones es automática.

e) Tasa de enfriamiento y congelación

Para evitar los daños de las células debido a la formación de cristales de hielo intracelular, la tasa de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta para deshidratar el agua intracelular. Mazur (1966) calculó la tasa de enfriamiento necesaria para la deshidratación de la célula mediante la aplicación de ecuaciones. De acuerdo a este cálculo, $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ o una caída menor de temperatura fue la apropiada para embriones de ratas (Kanagawa, 1995).

Los embriones mamíferos son congelados a una tasa lenta de menos de $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ en muchos casos. Whittingham en 1980 estimó que las membranas celulares de los embriones de diferentes especies tienen diferente permeabilidad al agua (Kanagawa, 1995).

f) Descongelación de embriones

La descongelación puede realizarse exponiendo las pajuelas a temperatura ambiente durante 10 segundos antes de colocarlas en baño María $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, 20-30 segundos (Rall y Meyer, 1986). En ésta debe estar presente un agente permeable extracelular como la albúmina sérica bovina (BSA) que proteja y estabilice las membranas celulares para que no se detenga el transporte de agua a través de éstas, evitando que la célula sufra lisis durante la difusión del crioprotector y daño en la capa trofoblástica (Celestinos y Gática, 2002).

Posteriormente, el contenido de la pajilla con el embrión, con la ayuda de micropipetas es depositado en una pequeña placa petri, donde bajo el microscopio estereoscópico es observado para evaluar su integridad. Las células de los embriones necesitan adsorber agua del

medio que los rodea y de esa manera, mantener el equilibrio osmótico y volver el volumen isotónico fisiológico (Palomino y Li, 2000).

g) Eliminación del crioprotector

Para que los embriones descongelados, puedan desarrollar su actividad, tanto *in Vivo* como *in Vitro*, una vez efectuada la descongelación del embrión; debe ser eliminado por completo el crioprotector mediante la rehidratación de sus células. Esto se realiza exponiendo al embrión a soluciones de concentraciones descendentes del porcentaje de esta sustancia hasta llegar a “0” y de esa manera evitar el shock osmótico que suele suceder en el caso que haya una gran cantidad de crioprotector y se lleve rápidamente a una solución salina isotónica (Palomino y Li, 2000).

Los crioprotectores pueden ser removidos de los embriones en tres y seis pasos en forma escalonada, hasta lograr una concentración final de PBS sin crioprotector. Saito *et al.* (1994) utilizó dos pasos sucrosa 0.5M. y 0.25M, manteniendo al embrión durante cinco minutos en cada una.

El embrión también puede transferirse en forma directa. Leibo (1984) desarrolló técnicas que permiten extraer el glicerol dentro de la pajuela, modificación conocida como “método de un solo paso en pajuela”, donde la variación radica en la disposición de las distintas soluciones (0.24M sucrosa, 1.4M G con el embrión y 0.25M sucrosa en PBS divididas las soluciones por columnas de aire). Esta técnica permite transferir embriones congelados a campo sin necesidad de equipos y laboratorios muy costosos, obteniendo tasas de preñez que oscilan entre el 30 y el 50 %. Cuando el glicerol es extraído dentro de la pajuela, los porcentajes de preñez se pueden ver afectados por prescindir de la evaluación morfológica (Niemann, 1991).

2.11.4 Factores que determinan la tolerancia a la criopreservación

La tolerancia al enfriamiento de los embriones puede depender de múltiples variables, que incluyen al mismo embrión y una serie de operaciones en el laboratorio. Debemos considerar que los embriones de cada especie, tienen sus propias variables; si se controla bien estas situaciones de cambio se puede tener éxito en la congelación de los embriones (Palomino y Li, 2000).

Un embrión ideal para ser transferido o criopreservado debe tener concordancia entre el estadio de desarrollo y el tiempo de recuperación de los mismos (número de días post fertilización). Cuando los embriones están en un menor estadio de desarrollo en relación al tiempo de recuperación, su crecimiento podría detenerse, o podrían tener un desarrollo muy lento (Kanagawa, 1995). Entre las principales variables podemos señalar:

a) Estadío del desarrollo embrionario

Se ha demostrado lo importante que es el estado de desarrollo embrionario en la velocidad de penetración del crioprotector. Leibo (1977) demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debería a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo, y debe ser considerado en el momento de seleccionar un embrión que será criopreservado.

Varios investigadores coinciden en que el estadio que ofrece mejor viabilidad son los blastocistos, los cuales varían en la edad dependiendo de la especie (Saito *et al.*, 1994; Callensen *et al.*, 1995; Skidmore y Loskutoff, 1999; Dobrinsky *et al.*, 2000; Pedro *et al.*, 2005). Cocero *et al.* (2000) determinaron que la etapa de desarrollo más apropiada para vitrificar embriones de ovejas producidos *in Vivo* o *in Vitro* fueron la mórula compacta y el blastocisto temprano. Y en otro estudio observaron que embriones de 7 días demostraron mayor viabilidad post descongelación (90%), frente a embriones más tardíos (8 días, 78%) Niemann *et al.* (1991).

Clasificación del estadio del desarrollo (IETS)

Después de la fertilización, el óvulo sufre mitosis. Con la ayuda de un microscopio las células individuales pueden ser contadas hasta la cuarta división (16 células), y los embriones son nombrados de acuerdo a su número de células; embrión de una célula, embrión de 4 células, etc.

Cuando los embriones tienen más de 16 células, es llamado mórula, ya que la masa celular asemeja una mora. Con el desarrollo, la mórula se hace compacta y forma una cavidad; entonces el embrión es llamado blastocisto. La cavidad luego se expande y el embrión se libera de su zona pelúcida transparente (Eclosión, en inglés hatching) (Kanagawa, 1995).

Características más detalladas de cada estadio se citan a continuación:

Mórula. Las blastómeras individuales son difíciles de diferenciar una de otra. La masa celular del embrión ocupa la mayoría del espacio perivitelino

Mórula compacta. Las blastómeras individuales tienen una masa compacta. La masa embrionaria ocupa 60 a 70 % del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano. Es un embrión que ha formado una cavidad llena de fluido y da una apariencia general de un anillo. El embrión ocupa 70 a 80 % del espacio perivitelino; es la fase de transición de una mórula tardía a un blastocisto.

Blastocisto. Hay una diferenciación marcada e la capa del trofoblasto más externa y la masa celular interna (MCI) más compacta y oscura. El blastocele es bien prominente con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino.

Blastocisto expandido El diámetro del embrión incrementa dramáticamente con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida hasta aproximadamente un tercio de su grosor original.

Blastocisto eclosionado o liberado Cuando la cavidad del blastocisto se ha expandido completamente, el embrión rompe la zona pelúcida y se libera de esta (liberación, hatching). El embrión liberado es redondeado hasta el doceavo día, pero después se hace oval, y rápidamente aumenta de tamaño.

b) Calidad de embriones

Los embriones más calificados, representan un determinante importante para el éxito de la congelación, tanto es así, que solamente embriones de alta calidad son los indicados para el proceso de congelación ; por lo que cerca del 15 % de los embriones recolectados deben ser descartados o implantados en estado fresco (Palomino y Li, 2000).

La Embryo Transfer Society (IETS, 1998) clasifica los embriones en cuatro calidades: Excelente o Bueno, regular, pobre y degenerado. Y para ello toma en cuenta los siguientes parámetros morfológicos: Forma del embrión, color y textura del citoplasma celular, número y compactación de las células, variación del tamaño de las células, tamaño del espacio perivitelino, número y tamaño de las vesículas, presencia de blastómeras degeneradas y extruídas y debris celular, apariencia de la zona pelúcida.

Excelente: un embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. Se congela con muy buenos resultados.

Bueno: pequeñas imperfecciones como unas cuantas blastómeras extruídas, formas irregulares, pocas vesículas. Congelación con resultados satisfactorios.

Regular: problemas más definidos, incluyendo la presencia de blastomeras extruídas, vesiculación y pocas células degeneradas. Pueden ser congelados con resultados generalmente de regular a pobre.

Pobre: severos problemas, numerosas blastomeras extruídas, células degeneradas, células de diversos tamaños. Generalmente los embriones son no transferibles, no deben ser congelados.

Degenerado: blastómeras desorganizadas, las células tiene muchas vesículas y gránulos. Embrión no transferible

No fertilizado: No hay una masa celular; pueden aparecer a veces fragmentos como algunas blastómeras.

c) Contenido de Lípidos

El contenido de lípidos de oocitos y embriones es un parámetro importante ligado tanto a la calidad y a la criotolerancia. Los cambios físicos de lípidos sometidos a las temperaturas de congelación están entre las mayores causas de daño celular por criopreservación. No sólo los lípidos intracelulares sino también la composición lipídica de las membranas contribuyen a las diferencias en la sensibilidad a los daños por enfriamiento.

Algunos factores, tales como el origen de los oocitos o del embrión (producidos *in Vitro* o derivados *in Vivo*), especie, estado fisiológico y nutrición de la donadora han demostrado ser determinantes para el contenido de lipídico (Abe *et al.*, 2002a; McEvoy *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2001, 2002; Steel y Hasler 2004; Genicot *et al.*, 2005).

En condiciones *in Vitro*, el contenido de lípidos puede estar influenciado por el ambiente de cultivo del embrión. Se le atribuye a la presencia de suero ser responsable de la excesiva acumulación de lípidos, a través de un aumento en el consumo de éstos del medio o por fallas el metabolismo de las mitocondrias (Abe *et al.*, 2002b).

Por el contrario, el cultivo de embriones en sistemas libres de suero reducen la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en blastocistos bovinos y mejora su resistencia a la criopreservación (Abe *et al.*, 2002 b; Pereira y Marques 2007).

La alta criosensibilidad de oocitos y embriones porcinos está asociada con su alto contenido lipídico (Nagashima *et al.*, 1999). Otros trabajos también han concordado con la idea que el contenido lipídico plasmático, en número y tamaño de gotas lipídicas se asocian a la reducida criotolerancia (Abe *et al.*, 2002b; Seidel, 2006).

En equinos la presencia de una cubierta embrionaria similar a la mucina que se deposita en la superficie interna de la zona pelúcida en el blastocisto temprano, es el responsable del flujo limitado del crioprotector hacia el interior del blastocisto expandido. En consecuencia, los embriones equinos de 6 días más pequeños, son más resistentes a los daños que los más grandes de 7 días (Hochi *et al.*, 1995).

Cuadro 2. Diferencias en la resistencia a la criopreservación de oocitos y embriones, dependiendo de la especie, estadio de desarrollo y origen

	Más Resistente	Menos Resistente
Especie	Bovino, ovino	Porcino, equino
Estadio de desarrollo	Mórula, Blastocisto Temprano, Blastocisto	Blastocisto eclosionado y oocito
Origen	Embriones derivados <i>in Vivo</i>	- Embriones producidos <i>in Vitro</i> - Embriones micromanipulados

Pereira, R.; Marques, C. 2008

2.11.5 Determinación de la viabilidad

Para determinar la viabilidad de los embriones se han desarrollado métodos, tales como: Cultivo celular con el fin de observar si el desarrollo embrionario continúa *in Vitro* (Renard *et al.*, 1980; citado en Kanagawa, 1995) determinando el número células vivas y muertas utilizando tinciones fluorescentes (Kaidi *et al.*, 2001; Cuello *et al.*, 2008) metabolismo celular determinando el consumo de glucosa , eliminación de CO₂ (Kaidi *et al.*, 2001), morfología de células embrionarias mediante microscopia electrónica (Morh and Trouson, 1981; Fabian *et al.*, 2005, Kanagawa, 1995).

2.11.6 Dispositivo de almacenamiento

Para la conservación óptima los embriones deben permanecer congelados a temperaturas extremadamente bajas, por ello normalmente se almacenan en criocontenedores especiales (tanques) conteniendo nitrógeno líquido a – 196°C (Bo *et al.* 2003). Estos criocontenedores constan del interior hacia fuera de un área de almacén, donde van las canastas y canastillas que contienen las pajillas con los embriones sumergidos en nitrógeno líquido; otra parte de aislamiento y al vacío, constituida de una pared absorbente. Finalmente, una cubierta de aluminio el cual tiene surcos que sirven para sujetar los ganchos de las canastas.

Para garantizar la conservar de los embriones en los tanques es necesario reabastecer el congelador con nitrógeno cada cierto tiempo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

Las actividades experimentales del presente estudio se realizaron en dos lugares diferentes, de acuerdo al tipo de evaluación realizada: Evaluación *in Vitro* y Evaluación *in Vivo*. La evaluación *in Vivo* del experimento se realizó en el anexo Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA – INIA, ubicado a 4200 msnm, en el distrito de Santa Lucía, perteneciente a la provincia de Lampa, departamento de Puno, a 15°04' de latitud Sur y a 70°18' de longitud Oeste, durante los meses de Febrero y Marzo del año 2008. La evaluación *in Vitro* del experimento se llevó a cabo en el Área de Biotecnologías Reproductivas del Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM.

3.2 Unidades experimentales

3.2.1. Animales

Se utilizaron 59 llamas hembras adultas, distribuidas en 23 donadoras y 36 receptoras. Las hembras seleccionadas tuvieron edades comprendidas entre 3 y 6 años, con peso promedio de 115 Kg. y buena condición corporal. Los animales presentaron un óptimo historial reproductivo y buenas condiciones fisiológicas. Todas las hembras recibieron las mismas

condiciones de manejo (ausencia de macho) y fueron alimentadas *ad libitum* bajo un sistema de pastura naturales.

3.2.2 Embriones

Se utilizó 73 embriones de un total de 81; los cuales fueron distribuidos en 30 para vitrificación, 29 para congelación lenta y 14 embriones frescos para control. La calidad de los embriones seleccionados correspondió a excelente o buena (Grado 1) y regular (Grado 2) adaptado para el estudio según el criterio de clasificación de la Internacional Embryo Transfer Society (EITS, 1998), y de acuerdo a ello se eliminaron 8 embriones por ser de grado diferente a los señalados.

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Diseño experimental

Los embriones utilizados para el desarrollo del estudio, fueron distribuidos entre los tres grupos experimentales en forma aleatoria, con un diseño completamente randomizado, según se señala a continuación:

G1= Grupo control: Embriones frescos (n=14)

G2 = Embriones vitrificados (n=30)

G3 = Embriones congelación lenta (n=29)

Aproximadamente el 50% de los embriones criopreservados fueron divididos al azar para su respectiva evaluación *in Vivo* e *in Vitro*, distribuidos de la siguiente manera (cuadro 3):

Evaluación *in Vivo* (transferencia embrionaria)

G1= Grupo control: 14 embriones frescos, transferidos a 13 receptoras (n=13)

G2= 16 embriones vitrificados, transferidos a 12 receptoras (n=12)

G3 = 11 embriones de congelación lenta, transferidos a 11 receptoras (n=11)

Se transfirió 2 embriones a 4 de las receptoras del G2. Se produjo ruptura embrionaria y colapsó de 4 pajillas del G3 durante el proceso de descongelación.

Evaluación *in Vitro*

G2= Embriones vitrificados (n=12)

G3 = Embriones congelación lenta (n=7)

No se realizó evaluación *in Vitro* de embriones frescos. Se perdieron 2 pajillas de G2 y 4 pajillas de G3. Tres pajillas del G3 colapsaron durante el proceso de descongelación (Fig. 01)

3.3.2 Metodología

3.3.2.1 Selección y superovulación de hembras donadoras

Se realizó la evaluación del tracto reproductivo (ovarios y útero) de llamas adultas seleccionando 23 hembras donadoras, mediante la técnica de ultrasonografía transrectal utilizando un ecógrafo modelo ALOKA SSD 500 con transductor lineal de 5.0 y 7.5 MHz.

Se seleccionaron aquellas hembras que presentaron un folículo ≥ 7 mm. Luego se indujo la ovulación aplicando 1 ml GnRH (0.0042 mg Acetato de Buserelina; análogo sintético de GnRH, Conceptal - Intervet) (Día 0). Dos días después (Día 2), se evaluó por ecografía a las hembras para confirmar la ovulación y se administró un tratamiento superovulatorio con 1000 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada eCG (Folligon, Intervet). Cinco días después (Día 7) se le administró a los animales 1 ml vía intramuscular (i.m.) de Prostaglandina (0.25 mg cloprostenol, Análogo sintético de Prostaglandina, Lutaprost, Agroveter Market S.A) y al día siguiente (Día 8) las llamas fueron servidas por monta natural con machos de fertilidad comprobada y tratadas nuevamente con 1 ml de GnRH vía i.m., para asegurar la inducción de la ovulación. Se permitió una segunda monta 10 horas después de la primera (Huanca, 2005a).

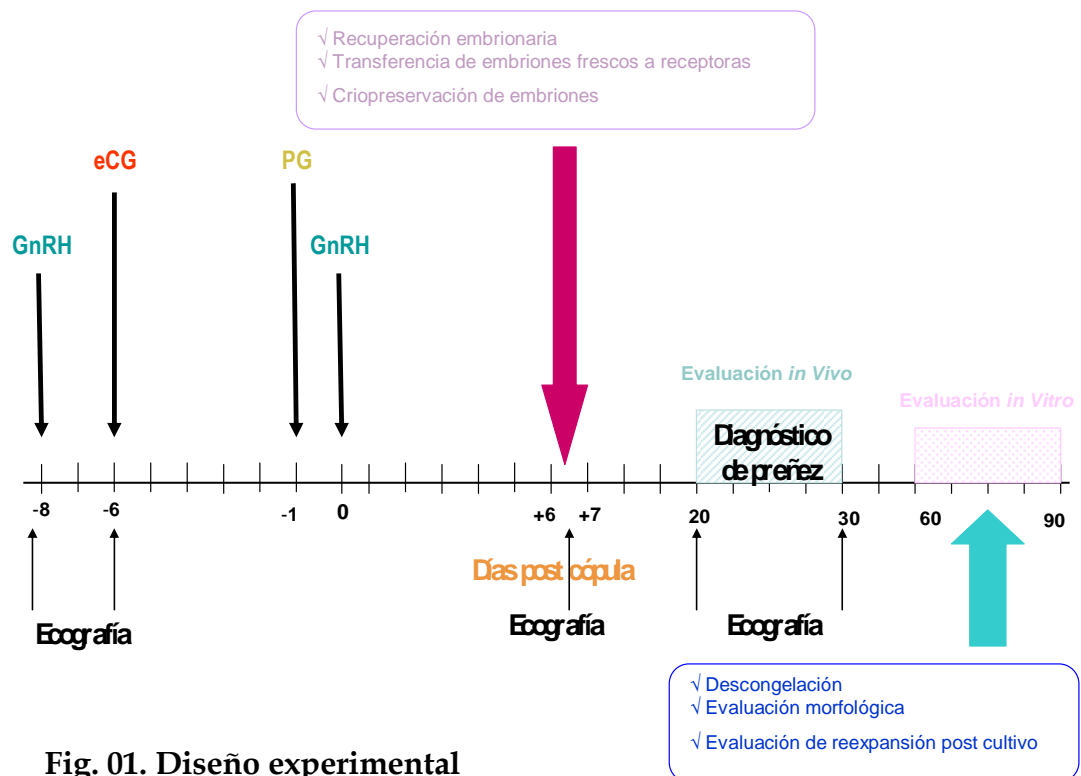


Fig. 01. Diseño experimental

3.3.2.2 Recuperación, evaluación y clasificación de embriones

La recuperación de embriones de las donadoras se realizó mediante un método no quirúrgico (descrito por Huanca, 2005a, 2005b) a los 6.5 días después de la primera monta. Se sujetó a cada hembra en posición de recumbencia y luego fueron sedadas con una inyección de 10 mg de acepromazina (Promazil) vía intramuscular y una administración anestésica local epidural con lidocaína al 2 % (Lab. Unidos S.A).

Cada cuerno uterino de las hembras fue lavado utilizando un catéter foley N° 18 de dos vías introducida por la cerviz hasta los cuernos uterinos, empleando 250 ml de medio de lavado para cada cuerno a una temperatura de 37°C. El medio de lavado estuvo compuesto de PBS (Sigma D1283) con 1 % de BSA (Sigma B4287), Penicilina Estreptomicina (Sigma, P4333) y agua bidestilada. El medio de lavado obtenido fue filtrado empleando Filtros Em-Com (poros de 75 micras, Agtech INC), para después ser observado en un estereomicroscopio (Nikon). Culminado el lavado de ambos cuernos uterinos, las llamas recibieron 1 ml vía i.m de PGF2 α (0.25 mg Cloprostenol; Lutaprost, Agrovit Maket). Los embriones obtenidos fueron transferidos a un medio de mantenimiento enriquecido, muy similar al medio de lavado, adicionado con 3 % BSA. Todos los embriones colectados fueron evaluados y clasificados según la calidad embrionaria, en base a la clasificación de la IETS; adaptada para el presente estudio. Se determinaron las siguientes calidades: grado 1: excelente o buena, grado 2: regular, grado 3: pobre, grado 4: degenerado.

3.3.3 Criopreservación de embriones

Los embriones luego de ser evaluados y clasificados, fueron distribuidos aleatoriamente a cada uno de los métodos de criopreservación:

a) Protocolo de vitrificación

Se utilizó el protocolo reportado por Von Baer et al. (2002) con modificaciones. El protocolo considera dos soluciones, una solución de equilibración (5% glicerol + 5 % etilenglicol + 0.2 M sucrosa + 10 % Suero fetal bovino + 50 ug/ ml Gentamicina) a una temperatura entre 25-26 °C, donde se coloca el embrión por 5 minutos y una solución de vitrificación (20 % Glicerol +20 % etilenglicol + 0.5 M Sucrosa +10% Suero fetal bovino + 50

ug/ ml Gentamicina), donde permanecen por menos de un minuto antes de ser colocados en pajillas de 0.25 ml (1 embrión/pajilla), y ser sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido.

b) Protocolo de congelación lenta

En base a los protocolos descritos por Palasz *et al.*(2000) y Lattanzi *et al.* (2002), los embriones fueron colocados en una solución de congelación (10% etilenglicol + 10% SFB + 50 ug/ml de gentamicina) a 26° C durante 5 minutos, para luego ser cargados en pajillas de 0.25 ml (1 embrión/pajilla) y sellados en el extremo contrario al tampón de algodón, permaneciendo a esa temperatura por 10 minutos adicionales. Para el protocolo de congelación lenta, se utilizó una técnica no convencional que permitió un descenso hasta 5°C, con una tasa de 0,12 °C/min en casi 3 horas, con la ayuda de un refrigerador. Posteriormente, se realizó el descenso hasta – 20°C, en la entrada del tanque de nitrógeno a una tasa de 5°C/min, para ser finalmente sumergidas en nitrógeno líquido (- 196° C).

3.3.4 Descongelación

a) Descongelación de embriones vitrificados

Este proceso consistió en extraer las pajillas del tanque de nitrógeno y mantenerlas a medio ambiente por 10 segundos, luego fueron entibiadas en baño María (37°C) por un minuto y el contenido fue vertido en una placa petri pequeña conteniendo 100 ul de solución de sucrosa 0.5 M. Inmediatamente los embriones fueron colocados en otra placa con solución de sucrosa con la misma molaridad, durante 5 min. Luego los embriones fueron colocados en una tercera placa petri con solución sucrosa 0.2 M durante 5 minutos; transcurridos este tiempo los embriones recibieron 3 lavados en solución de PBS + 20 % SFB.

b) Descongelación de embriones congelados

El día de la transferencia los embriones fueron descongelados de manera muy similar a los embriones vitrificados. Sin embargo, los embriones son vertidos a una primera placa con 100 ul de solución de sucrosa 0.25 M, inmediatamente son colocados en otra placa conteniendo la misma solución durante 5 minutos. Luego los embriones son colocados a una tercera placa petri que contiene 100 ul de una solución de sucrosa 0.12 M donde permanecerá por 5 minutos.

Después se siguió los mismos pasos que con los embriones descongelados por el método de vitrificación, fueron cultivados y finalmente transferidos a las hembras receptoras (Von Baer *et al.*, 2002).

3.3.5 Cultivo de embriones descongelados

Seguido al descongelamiento y lavado, se realizó el cultivo de embriones, previo a la transferencia y tinción de embriones evaluados *in Vivo* e *in Vitro*, respectivamente. En el caso de los embriones evaluados *In vivo* fueron cultivados durante 2 hrs. en gotas de 100 ul de PBS más 20 % SFB en un horno a 35 °C. Mientras que en los embriones evaluados *in Vitro* fueron cultivados por 1 hr. a 39 °C en una atmósfera compuesta por 5 % de CO₂, 20 % de O₂ y 75% de N₂ en el mismo medio.

3.3.6 Transferencia de embriones (evaluación *in Vivo*)

Pasado aproximadamente 2 hrs. de restablecimiento de los embriones descongelados, estos fueron cargados en pajillas de 0.25 ml con medio de mantenimiento de embriones para ser transferidos a la receptoras con la ayuda de una pistola de transferencia, siendo colocados en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo de cada hembra receptoras 6.5 días después de su inducción de ovulación.

Dieciséis (16) embriones vitrificados y 11 embriones congelados lentamente fueron transferidos a 12 y 11 hembras receptoras respectivamente. Cuatro de las receptoras del grupo vitrificación recibieron 2 embriones y 8 receptoras recibieron 1 embrión cada una. En caso de las receptoras de embriones congelados, 2 de ellas recibieron 2 embriones y 7 recibieron un embrión cada una.

Los 14 embriones del grupo control fueron transferidos a 13 hembras receptoras, una hembra recibió 2 embriones y las demás un embrión cada una.

3.3.7 Evaluación ecográfica

Se realizó la evaluación ecográfica entre los días los 14 y 24 después de la transferencia embrionaria; es decir, a los 20 a 30 días aproximadamente de preñez o edad del embrión.

3.3.8 Reexpansión embrionaria (evaluación *in Vitro*)

La reexpansión de embriones descongelados de ambos métodos de criopreservación fue observada luego del cultivo de los embriones. Se consideró un embrión reexpandido cuando este recupera o inicia un proceso de recuperación de la forma normal, y se rehidrata.

3.3.9 Tinción de embriones descongelados (evaluación *in Vitro*)

Pasada las 2 horas de cultivo, y luego de observar su reexpansión, 12 embriones del grupo vitrificación y 7 del grupo congelación fueron lavados 3 veces nuevamente en solución de PBS + 20% SFB, para luego ser evaluados en base a su calidad y morfología, de acuerdo al mismo criterio de clasificación utilizado antes de la criopreservación, finalmente se realizó la tinción de los embriones.

Doble tinción de embriones

El método de doble tinción de embriones será utilizado para probar las alteraciones de membrana. Las tinciones serán: Ioduro de Propidio (PI, Sigma) y la Bisbenzimidaz (BIS, Hoechst 3342, Sigma).

El Ioduro de Propidio es un marcador de ácido nucleico excluido de las células intactas; este sólo puede ingresar en las células con alteraciones en la integridad de la membrana (tinción color rojo seguida de la excitación con UV). La bisbenzimidaz ingresa a todas las células y se une, tanto específicamente y cuantitativamente, al DNA celular (tinción color azul seguida de la excitación con UV). En células con alteraciones de membrana, la fluorescencia del BIS es disminuida por el PI, el cual absorbe esta energía y emite fluorescencia roja.

Los embriones son incubados durante 15 minutos a 39°C en PBS con 10 ug/ml PI. Luego los embriones son fijados en 70% de etanol helado (5°C) por 5 min. Después se les transfiere a etanol con 10 ug/ml de Hoechst por 5 minutos a temperatura ambiente. Los embriones luego son colocados en una gota de glicerol en una lámina portaobjetos cubierto con un cubreobjeto para ser observado en un microscopio de fluorescencia modelo Zeiss KB-L8 (Kaidi *et al.*, 2001)

La viabilidad embrionaria se determina mediante la observación de núcleos fluorescentes, vista por la emisión del color azul.

Cuadro 03. Recuperación y distribución de embriones del estudio

Embriones recuperados	Embriones de Grupos experimentales		<i>Evaluación in Vivo</i>			<i>Evaluación in Vitro</i>		
			TOTAL	Transferidos	Colapsados	TOTAL	Teñidos	Colapsados y/o perdidos
13 mórulas	Control	14	14	14				
81 blastocistos (8 eliminados)	Vitrificado	30	16	16	0	14	12	2
	Congelado	29	15	11	4	14	7	7
TOTAL= 94 embriones		73	45	41	4	28	19	9

3.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por la prueba estadística de Chi-Cuadrado y Fisher exacta para determinar posibles asociaciones entre los tratamientos con la tasa de preñez y entre la calidad embrionaria antes y después con la tasa de preñez durante la evaluación *in Vivo*. Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para determinar la posible dependencia entre el diámetro embrionario y la tasa de preñez, así como, el diámetro del cuerpo lúteo y la tasa de preñez.

La prueba de Fischer exacta fue empleada para determinar la probable asociación entre los tratamientos con la tasa de reexpansión y asociación entre los tratamientos y la calidad embrionaria *in Vitro*. La dependencia entre el diámetro embrionario con la reexpansión embrionaria *in Vitro* se determinó mediante la prueba de T-Student.

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el programa estadístico STATA versión 10.0 (StataCorp, Texas USA) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Características de embriones recuperados

Se recuperaron un total de 94 embriones de las 23 donadoras, con una tasa de 65.3 % respecto al número de cuerpos lúteos observados por ecografía (n=144). El promedio de embriones recuperados fue de 4.0 ± 2.64 (rango 1 – 10). De los embriones recuperados, 13 fueron mórulas y ocho blastocistos, los cuales fueron descartados por ser de mala calidad, manteniéndose un total de 73 embriones en estadio de blastocisto liberado y distribuidos entre grupos experimentales. La distribución se presenta en la tabla 01.

Tabla 01. Calidad y diámetro de embriones recuperados según grupo experimental

Calidad	N° de Blastocistos		
	Controles	Vitrificados	Congelados
Excelente o Buena	12	15	22
Regular	2	15	7
TOTAL	14	30	29
Diámetro promedio (μm)	336.9 ± 35.14	278 ± 23.21	310 ± 26.52

El número de cuerpos lúteos y de folículos que no ovularon (anovulatorios) el día del lavado, fue de 6.55 ± 3.14 y 2.25 ± 2.50 respectivamente.

4.2 Evaluación *in Vivo*

Se recuperaron luego de la descongelación todos los embriones vitrificados (16/16). Mientras que en el grupo de congelación lenta se recuperaron 11 de 15 embriones, perdiéndose 4 embriones.

4.2.1 Diámetro y calidad embrionaria

El diámetro promedio para los grupos control, vitrificación y congelación fueron 336.9 ± 35.14 , 290 ± 34.5 , 319.1 ± 28.7 , respectivamente. No hallándose diferencia estadística significativa en esta variable entre los grupos experimentales ($p < 0.05$).

Se observó variación de la calidad embrionaria post descongelación en ambos métodos de criopreservación. Luego de la vitrificación 1 de 12 (8.33%) embriones cambió de calidad, disminuyendo de grado 1 a grado 2. También en el método de congelación lenta 6 embriones de 11 (54.55 %) disminuyeron de calidad (Tabla 02). Hallándose diferencia estadística significativa entre la calidad antes y después entre los grupos ($p < 0.05$).

Tabla N 02. Calidad embrionaria antes y después de descongelación *in Vivo*

	Calidad pre criopreservación		Calidad post descongelación		% Disminución de calidad
	Grado 1	Grado 2	Grado 1	Grado 2	
Control	10	3	NR	NR	NR
Vitrificación	6	6	5	7	8.33 (1/12)
Congelación lenta	10	1	4	7	54.55 (6/11)

Existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

NR= No se registró

4.2.2 Tasa de preñez de embriones y tamaño de cuerpo lúteo de receptoras

La tasa de preñez fue 16.67 % (2/12), 0 % (0/11) y 30.77 % (4/13) para las receptoras que recibieron los embriones vitrificados, congelados y controles respectivamente, encontrándose diferencia estadística significativa entre los grupo como se observa en la tabla 03. Ninguna de las hembras que recibieron 2 embriones post transferencia preñaron.

El promedio de los CL de las hembras receptoras que recibieron embriones de los grupos control, vitrificación y congelación fueron 10 ± 0.7 ; 9.92 ± 0.66 y 9.6 ± 0.61 respectivamente. No se halló diferencia estadística significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Tabla N° 03. Tasa de Preñez de grupos experimentales

	N° Receptoras	N° Receptoras Preñadas	*Porcentaje de Preñez (%)
Grupo Control	13	4	30.77
Vitrificación	12	2	16.67
Congelación lenta	11	0	0

* No existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

4.3 Evaluación *in Vitro*

Los embriones criopreservados y mantenidos en nitrógeno líquido fueron descongelados. Se recuperaron todos los embriones sometidos al protocolo de vitrificación (13/13), pero sólo se recuperaron 7/10 embriones sometidos al protocolo de congelación lenta, debido al colapso de algunas pajillas.

4.3.1 Características morfológicas embrionarias post descongelación

Luego de la descongelación, durante el proceso de dilución del crioprotector (salida del crioprotector), los embriones de ambos métodos presentaron características morfológicas normales y anormales. Estos cambios fueron determinados según la clasificación de la IETS (1998) adaptado para el estudio, los que se detallan en la tabla N° 04.

Tabla N° 04. Características morfológicas embrionarias post descongelación *in Vitro*

	Grupo Vitrificación	N° embriones (12)	Grupo Congelación Lenta	N° embriones (7)
Cambios normales	Al inicio el embrión está contraído y se restablece conforme pasa el tiempo (se hidrata)	9	Embriones mantienen similar morfología (No contraídos), y casi no se observa descamación de células	4
Cambios anormales	Descamación de células, oscurecimiento de células	3	Embriones estuvieron muy contraídos, con células descamándose o gran porcentaje de células oscuras	3

Calificación de calidad de embriones adaptado para el estudio según el criterio de clasificación de la Internacional Embryo Transfer Society (EITS, 1998).

4.3.2 Calidad embrionaria post descongelación

Se observó una variación de la calidad embrionaria post descongelación en ambos métodos de criopreservación. Para vitrificación se observó una disminución de la calidad 3 de 12 embriones (25%). También en el método de congelación lenta se observó que una disminución de calidad de 4 de 7 embriones (57.14%), siendo esta diferencia no significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla N°05).

Tabla N 05. Calidad embrionaria antes y después de descongelación *in Vitro*

	Calidad pre criopreservación		Calidad post descongelación			% Disminución de calidad
	Grado 1	Grado 2	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Vitrificación (n=12)	4	8	3	4	5	25 (3/12)
Congelación lenta (n=7)	4	3	2	2	3	57.14 (4/7)

No existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

4.3.3 Porcentaje de Reexpansión embrionaria

Posterior al procedimiento de descongelación, un 75 % (9/12) de embriones vitrificados reexpandieron, mientras que sólo un 57,14 % (4/7) de los embriones sometidos a congelación lenta presentaron reexpansión, siendo esta diferencia no significativa ($p < 0.05$).

4.3.4 Tinción de embriones descongelados

La determinación del número de células viables de embriones de ambos grupos, mediante la doble tinción fluorescente (PI/Hoechst), no fue posible debido a problemas técnicos no permitieron ver la fluorescencia. Sin embargo, en tres embriones vitrificados fue posible observar que el promedio del número de núcleos emitiendo fluorescencia azul (Hoechst) fue 633.67, correspondiendo al 68.95 % del promedio total de núcleos que fue 919. Un menor porcentaje de núcleos emitieron fluorescencia roja (31.05%), en promedio fue 285.33 núcleos rojos. El número de núcleos equivale al número de células embrionarias.

**Tabla 06. Características morfológicas embrionarias durante Descongelación y Tinción
(Grupo Vitrificado)**

Nº
Emb
20

Sucrosa 0.5



Contraído al inicio, de a poco se restablece o rehidrata

Sucrosa 0.25



No se restablece completamente, colapso de cavidad blastocélica, células oscuras

Post Cultivo



No Reexpandió

Características de tinción



No se aprecian con claridad los núcleos de las células

42



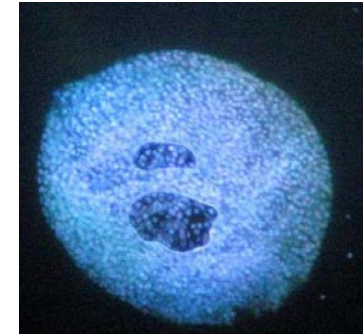
No se registro los cambios morfológicos en estereoscopio



Fotos de microscopio de luz



Reexpandió



Mayoría de células con fluorescencia azul

Nº
Emb
48

Sucrosa 0.5



Se restableció totalmente
Células descamándose en el
perímetro y oscuras

Sucrosa 0.25



Se restablece, con células
perimetrales descamándose

Post Cultivo



Reexpandió

Características
de tinción



Todas rojas. Pocas azules
Dos embriones se fusionaron
(posible alteración de la tinción)

52



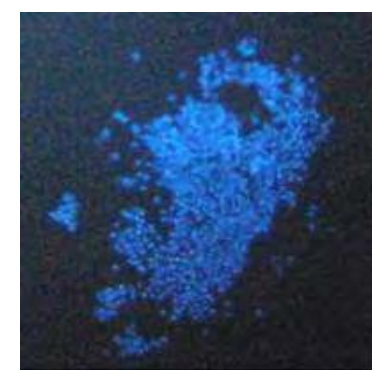
Al inicio alargado se fue
restableciendo con el tiempo.
Mayoría de células oscuras



Células descamándose. Parece
que tiene una rajadura en la zona
del trofoblasto, colapso de
cavidad blastocélica



No Reexpandió



Mayoría de células rosadas,
embrión destruido

Nº
Emb
56

Sucrosa 0.5



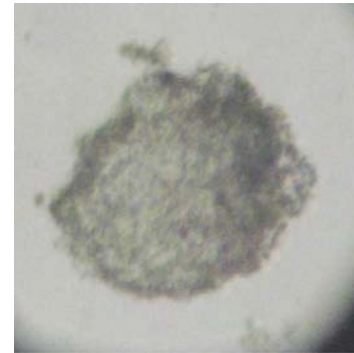
Al inicio contraído con células
perimetrales descamándose.
Células oscuras

Sucrosa 0.25



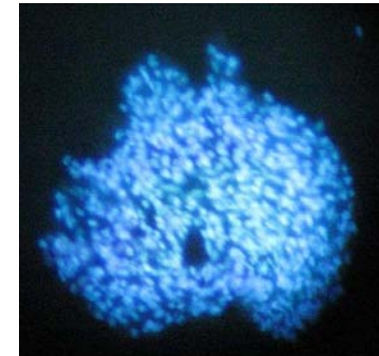
Finalmente se restablece
ligeramente y células
perimetrales parecen descamarse

Post Cultivo



Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

58



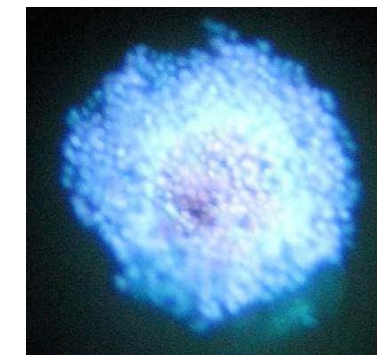
Esférico, ligera contracción
central, células descamándose y
se expande lentamente



Pocas células descamándose y se
mantiene ligeramente contraído.



Reexpandió



Aproximadamente 70% de
núcleos azules y 30% rojos

Nº
Emb
62

Sucrosa 0.5



Ovalado, presenta una rugosidad central, pero esta restableciendo.

Sucrosa 0.25



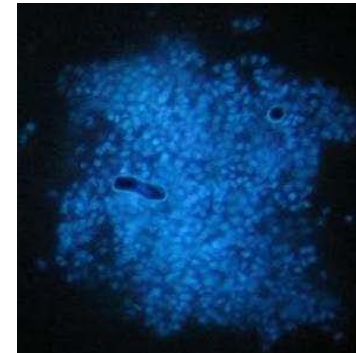
El embrión se restablece pero no totalmente

Post Cultivo



Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

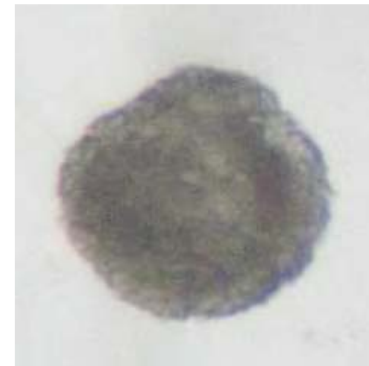
64



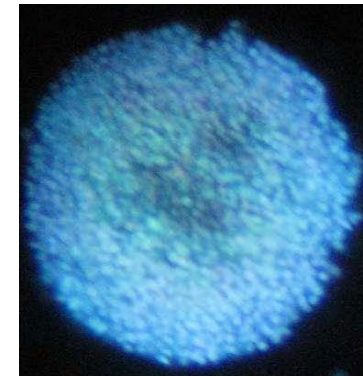
Esférico, casi no tiene células descamándose



Se restableció un poco. Ya no está tan contraído



Reexpandió



Mayoría de células con fluorescencia azul

**Tabla 07. Características morfológicas embrionarias durante descongelación y tinción
(Grupo Congelado)**

Nº
Emb
15

Sucrosa 0.2



Ovalado, no está contraído. Se nota su trofoblasto

Sucrosa 0.12



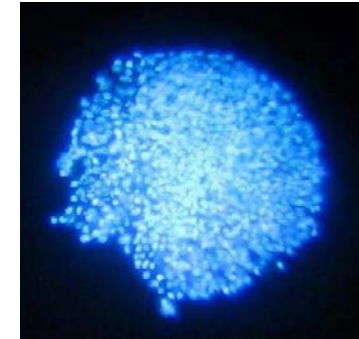
Ya no esta tan ovoide, y algunas células se oscurecen

Post Cultivo



Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

23



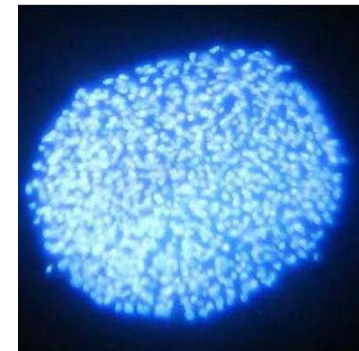
Esférico, no contraído, no hay células descamándose, se nota bien el trofoblasto.



Ya no esta tan esférico, se ha deformado su contorno y hay algunas células oscuras



Reexpandió



Perdió fluorescencia

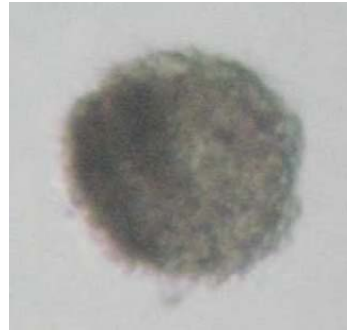
Nº
Emb
51

Sucrosa 0.2



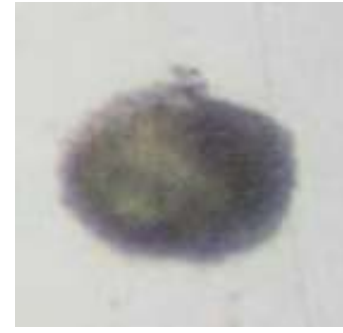
Presenta la mayoría de células muy oscuras (más de 50%). Ligera descamación de células

Sucrosa 0.12



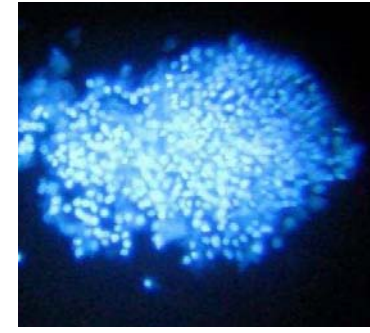
Se ha restablecido un poco, se ve más esférico pero continúa el oscurecimiento

Post Cultivo



No Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

55



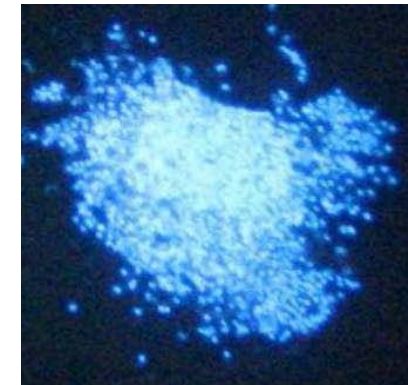
Contraído inicialmente, se expande luego y no hay células descamándose.



Morfología muy similar, hay más células descamándose. Se restablece ligeramente



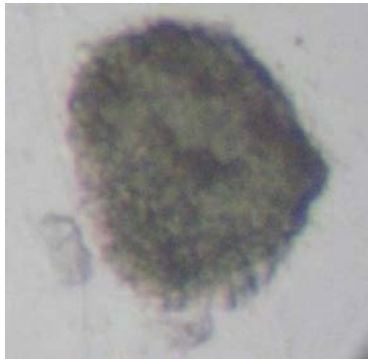
No Reexpandió



Perdió Fluorescencia

Nº
Emb
59

Sucrosa 0.2



Bien arrugado con células
perimetrales descamándose

Sucrosa 0.12



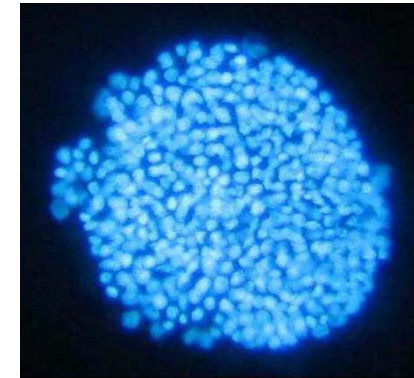
Más células descamándose.
Mayoría de células oscuras

Post Cultivo



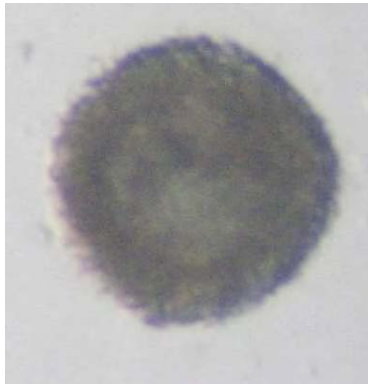
No Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

61



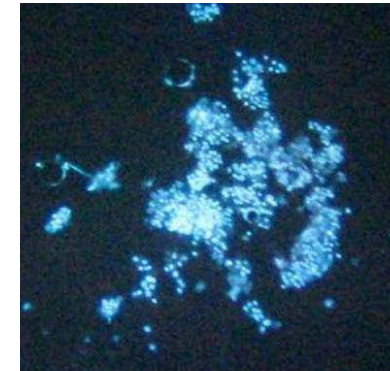
Esférico con células oscuras y
descamándose en la periferia



Casi no se restablece y de
similares características a la
solución anterior



Reexpandió



Perdió la fluorescencia

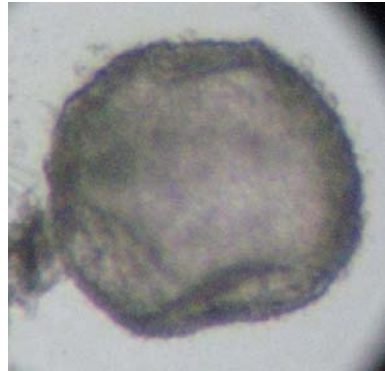
Nº
Emb
63

Sucrosa 0.2



Bien esférico, no contraído, casi no hay células descamándose y algunas células oscuras

Sucrosa 0.12



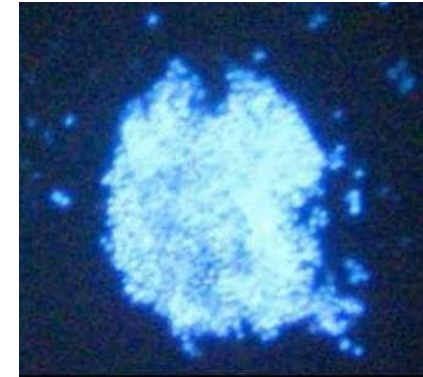
Perímetro bien arrugado y leve descamación. Se nota el trofoblasto del aparente MCI (que esta oscuro)

Antes de tinción



Reexpandió

Características
de tinción



Perdió fluorescencia

V. DISCUSIÓN

En llamas los protocolos de superovulación utilizando FSH y eCG han sido efectivos para inducir crecimiento folicular ovárico (Ratto *et al.*, 2005). Permitiendo la recuperación de 5,8 embriones/donadora al utilizar eCG (Huanca, 2005a), similar a lo recuperado en el presente estudio (4.04 ± 2.64). Empleando esta misma hormona Aller *et al.* (2002); han reportado buenas tasas de recuperación de embriones respecto al número de cuerpos lúteos (83%, 10/12); porcentaje similar se obtuvo en el presente estudio (65.28 %, 94/144). Ambos resultados son superiores al 30 % (5,4/18,3) observado al superovular con FSH (Ratto *et al.*, 2005). Sin embargo, una desventaja de eCG podría ser el hecho de estimular el crecimiento folicular aún después de la ovulación, ya que su vida media biológica es de aproximadamente 5 días (Dieleman y Bevers, 1987); por tanto un gran número de folículos grandes pueden ser observados en los ovarios de donadoras el día de la recuperación de embriones (Aller *et al.*, 2002). Esto explica la presencia en el estudio de 6.55 ± 3.14 cuerpos lúteos junto a 2.25 ± 2.50 y folículos grandes (folículos de 6 a 19 mm de diámetro) en el día de la recuperación de embriones. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Bourke *et al.* (1995), quienes observaron 5,3 cuerpos lúteos y 6,0 folículos grandes al emplear eCG. La presencia de folículos grandes que no llegan a ovular podría inducir a falla sobrevivencia embrionaria, y en la disminución del número de embriones recuperados el día de del lavado uterino de hembras donadoras. En vacas y ovejas se ha observado una fuerte actividad contráctil durante el estro, mientras que estas disminuyen y son localizadas durante la fase luteal (Hawk, 1983, citado por Suarez, 2006). La presencia de quistes foliculares producen altas concentraciones de estradiol,

originando el incremento de la contractilidad del tracto reproductor femenino y con ello un tránsito acelerado de los embriones a través de este, en el período post monta. De esta manera los posibles embriones formados podrían ingresar al útero de manera prematura, encontrando un medio uterino no adecuado y al no haber desarrollado lo suficiente no sería capaz de iniciar el reconocimiento maternal, originándose una mortalidad embrionaria temprana.

No obstante, a la posible desventaja con la eCG, tanto en el presente como en previos estudios (Huanca, 2005a, Huanca, 2005b) se han recuperado mayor número de embriones al utilizar esta hormona en los protocolos de superovulación en llamas y alpacas.

Los reportes nos indican que la sensibilidad del embrión a la criopreservación varía con el estadio y especie; y sería un inconveniente a superar para una aplicación práctica del método de criopreservación. Se debe tener en cuenta la sincronía entre el estadio, edad y ubicación del embrión, el cual difiere entre especies. Los embriones atraviesan la unión utero-tubal e ingresan al útero en el estadio de mórula entre los días 5 y 6 en yeguas, al día 4 en ratas (Suárez, 2006), en ovejas entre los días 4-5 y es un blastocisto formado por el día 6 (Spencer *et al.*, 2007). Estudios en llamas superovuladas han recuperado al día 7 o alrededor de este día post monta blastocistos liberados (Huanca *et al.*, 2004; von Baer *et al.* 2002; Palasz *et al.*, 2000), es decir aproximadamente 6 días de edad del embrión (período monta-ovulación 30 Hrs, Huanca, 2001), lo que haría suponer que en llamas al igual que en alpacas (Cervantes, 2008) el desarrollo embrionario sería mucho más rápido comparado con otros mamíferos, y por tanto los lavados no quirúrgicos uterinos podrían realizarse antes del día 7 post monta. Por ello, el día de la recuperación embrionaria en el presente estudio fue al día 6.5 post monta. También se ha obtenido en otras especies buenos resultados criopreservando embriones más tempranos (blastocisto temprano y expandidos) tanto *in Vivo*, como *in Vitro* (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Caracciolo di Brieza *et al.*, 2004; Hochi *et al.*, 1994; Bilton y Moore, 1979). En consecuencia, en el presente estudio sólo los embriones en estadio de blastocistos formaron parte de los grupos experimentales, considerando al estadio de mórula como no apto para el estudio, por estar posiblemente atrasado en su desarrollo embrionario para el día del lavado. Sin embargo, a pesar de que la recuperación embrionaria fue mas temprano, al día 6.5, la mayoría de los embriones recuperados estuvieron en estadio de blastocisto liberado (86.17 %, 81/94), ya que no se evidenció la presencia de zona pelúcida; y se recuperaron 13 mórulas (13.83%, 13/94).

En el estudio se recuperaron al día 6.5 post monta 81 embriones en estadio de blastocisto, a los cuales se les clasificó en tres distintas calidades: Excelente o bueno (n = 53)

regular (n = 24) y mala (n = 4) de acuerdo al criterio de clasificación de la Internacional Embryo Transfer Society (EITS, 1998), adaptado para el estudio. De los cuales sólo se criopreservaron los de buena y regular calidad. La calidad del embrión parece estar influenciado por la donadora superovulada, debido probablemente a los cambios hormonales y estructurales en los fluidos foliculares y oocitos respectivamente, durante el período preovulatorio y que podría afectar la fertilización y desarrollo embrionario temprano (Callensen *et al.*, 1986; Bever, 1987). La calidad embrionaria parece también estar relacionado a la futura tasa de preñez, como lo demuestra el estudio realizado por Abe *et al.*, (2002) en el que embriones de bovinos de excelente, buena, regular y pobre calidad resultaron en 45, 44, 29, 20 % de tasa de preñez respectivamente.

Durante el proceso de congelación y descongelación hay muchos factores que deben tenerse en cuenta para asegurar el buen manejo. Entre uno de éstos factores está la concentración de los crioprotectores, los que pueden causar toxicidad y estrés osmótico si están en concentraciones muy elevada; o la vitrificación del medio podría ser inadecuada (solidificación no homogénea), si la concentración es muy baja (Cuello *et al.*, 2008). Trabajos realizados hasta la actualidad, utilizando diferentes protocolos de criopreservación de embriones de llama han obtenido diferentes resultados de sobrevivencia *in Vivo* e *in Vitro*. El crioprotector más utilizado para criopreservar embriones de llamas es el etilenglicol (EG), que ha permitido mayor viabilidad; y algunos estudios *in Vivo* (Aller *et al.*, 2002) e *in Vitro* (von Baer *et al.*, 2002; Lattanzi *et al.*, 2002; Palasz *et al.*, 2000) han demostrado que es posible vitrificar utilizando este crioprotector. También en camellos dromedarios (*Camelus dromedarius*) es el EG, junto al glicerol y DMSO, el crioprotector que ha demostrado conserva la calidad embrionaria inmediatamente después de la descongelación (Skidmore y Loskutoff, 1999). Todos estos estudios motivaron la elección del EG como crioprotector permeable en ambos métodos del estudio.

El método de vitrificación en el estudio se realizó teniendo como base el reportado por Von Baer *et al.* (2002), haciéndole algunas modificaciones. La concentración final de crioprotectores permeables fue el de 40 %, al igual que el de Von Baer, pero además de utilizar y etilenglicol (EG), se adicionó glicerol (G), es decir se dividió las concentraciones en 20% de EG y 20% de G. Esta modificación se justifica por el hecho de que la combinación de crioprotectores podría reducir la posibilidad de toxicidad. El etilenglicol al ser un crioprotector permeable de un bajo peso molecular (PM= 62,07) en comparación con otros crioprotectores su tasa de permeabilidad o entrada hacia las células embrionarias es mayor; por tanto, su probabilidad de causar toxicidad es mayor. Al combinarlo con otro crioprotector, como el

Glicerol, de un mayor peso molecular (PM= 92,10), y una moderada tasa de permeabilidad; la cantidad o concentración final de EG disminuirá, ingresando y ocupando finalmente el espacio intracelular; el EG y el Glicerol, con una concentración probablemente mayor del primero, por ser una molécula más pequeña, lo que podría disminuir la posibilidad de toxicidad por exceso de este crioprotector. También en el protocolo de vitrificación reportado por Aller *et al.* (2002) se empleó concentraciones similares de estos dos crioprotectores permeables, pero además se agregó otros crioprotectores permeable y no permeable. A pesar de que estos autores reportaron aparentemente una exitosa sobrevivencia embrionaria *in Vivo* (50% de preñez), el escaso número de animales le resta confiabilidad al estudio.

En equinos Hochi *et al.* (1994) fueron los primeros en obtener preñeces de un embrión vitrificado. El protocolo que utilizaron consistió en un 40 % de EG, 18 % Ficoll, y 0,3 M Sucrosa; protocolo con el cual obtuvieron 2 preñeces de 5 embriones transferidos (estadio de mórula y/o blastocistos tempranos). También en otra investigación en equinos Caracciolo di Brienza *et al.* (2004) reportaron 4 de 6 preñeces al día 16 después de la transferencia de embriones pequeños (<300 μ m), utilizando 3.4 M de glicerol y 4.6 M EG. Estos trabajos vitrificando embriones equinos han reportado buenos porcentajes de preñez utilizando semejantes concentraciones de etilenglicol, lo cual haría suponer que este porcentaje podría ser también adecuado para los embriones de llamas, como lo ha sido con otras especies. Aunque estos reportes en equinos utilizan poco número de animales, trabajos similares son necesario llevar a cabo en camélidos sudamericanos, ya que la única manera de saber si un protocolo de vitrificación es exitoso es transfiriendo a hembras receptoras los embriones descongelados y evaluando su viabilidad registrando la tasa de preñez y mejor aún el nacimiento de crías vivas.

Cabe mencionar que el número de pasos o soluciones al que los embriones son expuestos previos a la vitrificación, podría influir en la cantidad de crioprotector que ingrese a estos, y debe ser un aspecto importante que debe ser considerado. La elección sobre cuantos pasos debe realizarse durante la vitrificación podría estar relacionado al estadio embrionario; ya que se ha visto que blastocistos tempranos y expandidos que aún conservan la zona pelúcida, tienen mayor dificultad en el intercambio de los crioprotectores, necesitan mayor tiempo de exposición, por tanto, se requeriría más pasos para conseguir la equilibración y dilución de los crioprotectores en el embrión. Algunos autores consideran que un protocolo con un sólo paso, es decir sin una equilibración del embrión podría ser conveniente para embriones sin zona pelúcida (Cervera y García-Ximénez, 2003). Los embriones del presente estudio al ser blastocistos liberados, no tendrían dificultad en la difusión de los crioprotectores permeables, por lo tanto, se consideró que 2 pasos (una solución de equilibración y una de vitrificación)

serían suficientes. Tres pasos podría aumentar el riesgo de toxicidad por mayor posibilidad de ingreso de los crioprotectores, y un sólo paso, sin equilibración previa, podría causar shock osmótico al embrión, por un medio extracelular hiperosmótico.

Se consideró la adición de sucrosa en el protocolo de vitrificación por sus efectos favorables sobre las células embrionarias durante la vitrificación y la descongelación. La sucrosa fue adicionada de manera gradual; se agregó a una concentración de 0.2 M en la solución de equilibración y a 0,5 M (PM sucrosa=171,15) en la solución de vitrificación. La sucrosa por ser un crioprotector no permeable contribuye a la deshidratación de las células embrionarias durante la vitrificación, reduciendo la formación de cristales de hielo intracelulares. Mientras que durante la descongelación mantiene una alta presión osmótica en el medio extracelular, previniendo el shock osmótico y la lisis de las células embrionarias durante la remoción del crioprotector (Rall, 1987). Similares concentraciones de sucrosa permitieron liberación embrionaria, por tanto, una mejor sobrevivencia *in Vitro* de blastocistos bovinos en el estudio realizado por Martínez *et al.* (2002).

El método de congelación lenta tomó como base los protocolos realizados por Palasz *et al.* (2000) y el de Lattanzi *et al.* (2002). En ambos protocolos realizados en llamas se empleó una concentración de 1.5 M de EG, y la evaluación de la viabilidad embrionaria *in Vitro* registró buenos resultados. En camellos dromedarios, esta misma concentración de EG, utilizando el mismo método de criopreservación, reportó una tasa de preñez de 32 % (14 /43) (Skidmore *et al.*, 2004).

La evaluación *in Vivo* del presente estudio se determinó en base a la tasa de preñez de llamas receptoras luego de la transferencia de embriones criopreservados mediante ambos métodos, vitrificación y congelación lenta. La tasa de preñez obtenida con embriones vitrificados fue de 16.67 % (dos preñadas de 12 receptoras), lo que indica que es posible obtener gestación con el protocolo utilizado. No obstante, es una tasa baja, que no difiere estadísticamente del grupo de congelación (0 %, ninguna de las 11 hembras preñó), y tampoco difiere del grupo control (embriones transferidos frescos, 30.77 %). Todo ello se puede explicar a que el número de receptoras no fue lo suficientemente grande, haciendo que un sólo animal signifique un alto porcentaje. Es por ello que a pesar de que biológicamente las tasas de preñez entre los grupos de criopreservación son diferentes, estadísticamente no son significativas ($p < 0.05$).

El porcentaje de preñez de embriones vitrificados, difiere de un estudio anterior en el cual vitrificaron también embriones de llamas, utilizando un protocolo distinto. En este estudio la tasa de preñez fue del 50 %, sin embargo, el número de hembras receptoras fue de sólo 4, hecho que resta confianza al estudio (Aller *et al.*, 2002). Otro estudio reportó alrededor de 8 % de preñez de un total de 25 hembras camellas (*Camelus dromedarios*) en etapa reproductiva utilizando el método de congelación lenta. Este trabajo si bien es cierto que, no fue realizado en la misma especie es una buena referencia, debido a que los camellos son especies filogenéticamente cercanas a los camélidos sudamericanos, como la llama, lo que significaría que haya entre ellos características biológicas y fisiológicas embrionarias similares, como lo han demostrado varios estudios (Nowshari *et al.*, 2005).

La baja tasa de preñez en las hembras que recibieron embriones vitrificados y la ausencia de la misma en las que se les transfirió embriones congelados, no debe atribuirse sólo a un efecto directo nocivo de los crioprotectores sobre los embriones. En el caso del grupo de congelación lenta el tiempo de exposición y la tasa de descenso de temperatura parecen haber sido los factores que afectaron la viabilidad embrionaria *in Vivo*. La tasa de descenso de temperatura en el grupo de congelación lenta del presente estudio se realizó con la ayuda de un refrigerador, debido a que las condiciones de ubicación del lugar experimental (4200 msnm, baja presión de oxígeno), no permitió el funcionamiento de un equipo de congelación programable. La etapa de enfriamiento de los embriones la temperatura inicial del medio de congelación fue de 26 °C hasta llegar a 5°C, siendo la tasa de descenso 0,12°C/min, durante aproximadamente 2 hrs. Por lo general se recomienda una tasa de descenso de temperatura de 0.5-2.0 °C/min hasta llegar a los 5°C lo cual puede durar unos 15 min. (Leybo, 2008; Mapletof y Palasz, 2000). La menor tasa de descenso de temperatura ocasiona una entrada de los crioprotectores permeables a la célula y una deshidratación muy lenta, lo que conlleva a la formación de hielo intracelular (Fair *et al.*, 2001). En caso de la tasa de enfriamiento establecida en protocolos de congelación lenta desde -7°C a los -30°C es de 0.5°C /min . Sin embargo, en el presente estudio esta tasa fue de aproximadamente 5°C/min (desde 5°C a -20°C) durante 5 min.. La baja molaridad o concentración del crioprotector (1.5 M de etilenglicol), como suele utilizarse en este método de criopreservación, sumado a la mayor tasa de enfriamiento (5°C/min) del presente estudio posiblemente no permitieron una adecuada deshidratación de la célula, originando también la formación de cristales de hielo intracelular. Lo que aumenta la probabilidad de ruptura de membranas citoplasmáticas y destrucción de algunas de las células embrionarias (Mohr y Trounson; 1981).

Además otros daños a nivel ultraestructural probablemente se produjeron, así como se ha evidenciado en las células de embriones luego de la congelación; entre los que se reporta las alteraciones en mitocondria y en retículo endoplasmático rugoso, desmosomas pobremente desarrollados y falta de uniones estrechas (Fair *et al.*, 2001). Todo ello explicaría el daño ocasionado en los embriones de este grupo y su fracaso en la viabilidad *in Vivo*. Esto mismo se asociaría como causa de la ruptura de 4 de los 15 embriones descongelados (23.53 %) en la evaluación *in Vivo*, hecho que también se presentó al descongelar embriones de camellos en un (8.89 %), pero no así en embriones de otras especies como en ratas (Nowshari y Brem, 2001).

Por su parte la baja tasa de preñez de embriones vitrificados podría estar relacionada al efecto de la temperatura del medio de vitrificación (26°C), si bien es cierto, ésta no fue muy elevada, los protocolos ya establecidos sugieren una temperatura de 22 °C. Esta ligera elevación de temperatura pudo haber incrementado la tasa de permeabilidad del crioprotector, aumentando la velocidad de entrada del crioprotector hacia el interior de la célula, y con ello incrementándose la probabilidad de toxicidad de las mismas.

Otro factor determinante que no puede dejarse de lado y que pudo afectar por igual a ambos grupos es el factor receptora. La hembra receptora debe ser seleccionada al igual que la hembra donadora por sus buenas características reproductivas, lo cual se realizó en el estudio. Sin embargo, la alimentación y estado de todos los animales experimentales, al ser con pasturas naturales, estuvo sujeta a los cambios climáticos (heladas). En este contexto las deficiencias nutricionales del ambiente alrededor de la concepción tienen sus efectos más serios en la preñez durante los días previos a la ovulación y durante la concepción y la preñez temprana. Estas consideraciones dan a los fluidos del epitelio del oviducto y útero gran significancia por ser los tejidos maternos más importantes en los primeros días durante el establecimiento de la preñez (Wynn y Wynn, 1988, citado por Leese *et al.*, 2008). Además las deficiencias nutricionales han sido relacionadas a deficiente estado reproductivo en diferentes especies mamíferas. Whitaker *et al.*, (1993) encontraron menor de liberación de LH en respuesta a inyecciones de GnRH; Pereyra y Linares (1986, citado por Rutter, 2008) encontraron menores niveles de progesterona en vacas en vacas subalimentadas. En alpacas se ha reportado disminución en los niveles de progesterona en un 21 % de las hembras al día 15 post monta, sugiriéndose una mortalidad embrionaria temprana, considerando que los niveles basales de esta hormona en animales vacíos se encuentran ya al día 12 (Cordero *et al.*, 2006). Esto nos hace pensar que también en camélidos sudamericanos la nutrición podría relacionarse a una menor funcionalidad del cuerpo lúteo, y afectar por tanto el establecimiento de la preñez. Pero a diferencia de otras especies una mala

nutrición no es muy notoria, ya que no se ve reflejada en la condición corporal, como lo menciona estudio realizado en alpacas (Enciso, 2006).

El diagnóstico de preñez fue realizado utilizando la ultrasonografía transrectal entre los días 14 y 24 post transferencia, y considerando que la edad de los embriones el día del lavado y transferencia embrionaria fue de 6.5 días; la edad embrionaria estuvo en el rango de 19.5 y 29.5 días, respectivamente. Es factible detectar preñez desde el día 19 post empadre como lo realizaron Bourke *et al.* (1992). También ha habido reportes de diagnóstico de preñez más tempranos como al día 7 después de la monta, con un 100 % de certeza a los 34 días post monta (Parraguez *et al.* 1997).

La evaluación de la viabilidad embrionaria *in Vitro* tuvo como objetivo determinar el porcentaje de células viables y no viables en los embriones descongelados, luego de 1 hora de cultivo, utilizando una tinción fluorescente (Doble tinción Ioduro de propidio/ Bisbenzimidazina-tinción de Hoechst). Lamentablemente problemas técnicos no permitieron observar la fluorescencia de la mayoría de embriones del experimento (en los resultados se muestran algunos fotos de embriones con y sin fluorescencia). Sin embargo, fue posible determinar la viabilidad embrionaria *in Vitro* de tres embriones vitrificados, observándose la mayor parte de núcleos (cerca del 70%), emitiendo fluorescencia azul, por tanto casi el 70 % de células viables. Esto nos lleva a pensar que el método de vitrificación utilizado en el estudio dañó sólo un menor porcentaje de las células embrionarias, lo que se traduce en un mejor pronóstico de la futura viabilidad del embrión, y concuerda con los resultados de la evaluación *in Vivo*, en el que fue posible obtener preñez. Previo a la tinción de los embriones se observó y registró los cambios morfológicos de los embriones descongelados y la tasa de reexpansión embrionaria *in Vitro*. Es importante mencionar que posiblemente por el corto período de cultivo la mayoría de embriones no mostraron una completa reexpansión.

Se obtuvo un 75 % (9/12) y 57.14 (4/7) de reexpansión embrionaria en los grupos de vitrificación y congelación lenta, respectivamente; hallándose diferencia estadística significativa entre ambos. La reexpansión embrionaria indica la capacidad que tiene el embrión para poder eliminar el crioprotector y recuperar su morfología normal.

Se observaron algunos cambios morfológicos anormales en los embriones de ambos métodos de criopreservación. Entre ellos tenemos la presencia de detritus celular vista como una descamación de células, oscurecimiento de células, colapso de la cavidad blastocélica y la no reexpansión del embrión. La descamación de células embrionarias se podría atribuir a la

pérdida de las conexiones intercelulares en las células trofoblásticas, como se ha reportado que sucede en embriones bovinos vitrificados y sería también la causa del colapso del blastocele (Vajta *et al.*, 1997). Se observó también que algunos embriones en ambos métodos permanecieron arrugados, debido probablemente a la destrucción irreversible de los filamentos de actina, constituyentes del citoesqueleto de todas la células eucariotas, producto probablemente del daño osmótico, como se ha observado que sucede con embriones porcinos, y que no permitiría que el embrión se restablezca (Lang *et al.*, 1998). Según lo reportado por Men *et al.*, (2005) un alto porcentaje de embriones vitrificados y que presentaron cambios morfológicos se restablecen luego de un cultivo *in Vitro*, hecho que también fue observado en el presente estudio en el grupo de embriones vitrificados (75 % de reexpansión).

Durante el proceso de dilución del crioprotector, post descongelación, 4 de 7 embriones congelados lentamente (57.14 %) presentaron cambios aparentemente normales, inmediatamente después de colocarlos en la primera placa de solución de dilución (0.2 M sucrosa) ellos presentaron una morfología muy similar a la que tuvieran antes del inicio de la congelación. Esto podría deberse a un fenómeno similar al que sucedió en la prueba realizada por Mazur en oocitos de ratonas (Mazur, 1963, citado por Leibo, 2008); en esta prueba los oocitos fueron expuestos a un crioprotector con una concentración relativamente baja (DMSO a 1M) y enfriado a una tasa de enfriamiento moderadamente rápida (32°C). A los - 4°C rápidamente crecen cristales de hielo, a los -20°C los oocitos quedan atrapados en hielo extracelular, y a los - 40°C los oocitos abruptamente se oscurecen. Este oscurecimiento repentino de las células y embriones ha sido interpretado universalmente que es debido a la difracción de la luz, causada por pequeños cristales de hielo intracelular. En otras palabras, la célula se congela intracelularmente. También se notó que el tamaño de la célula cuando se congeló a -40°C fue muy similar a como fue antes del proceso de congelación. Este fenómeno es muy probable se haya producido en el grupo congelación teniendo en cuenta la moderada tasa de enfriamiento 5 °C/min (la recomendada es 0.5°C) que fue utilizada. Es por ello que 4 de los 7 embriones congelados parecen haber mantenido su morfología esférica; y se les consideró como embriones con cambios morfológicos normales. En la siguiente dilución (0.12 M), se produjo la salida del crioprotector, esto se hace evidente por la irregularidad y contracción del embrión, como si se estuviera deshidratando, para luego retornar a su forma casi esférica inicial luego de una hora de cultivo, (reexpandieron). Estos 4 embriones aparentemente no fueron dañados por el proceso, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que puedan haber sido dañados intracelularmente por el crioprotector permeable (EG), ya que ninguno de los embriones de este mismo grupo, en la evaluados *in Vivo*, produjo preñez. Por otra parte, los 3 embriones restantes (42,86 %) del grupo congelación, presentaron características de cambios

morfológicos anormales; y permanecieron contraídos durante todo el proceso de dilución, con poca evidencia de cambios del volumen del embrión como consecuencia de hidratación o deshidratación (no reexpandieron), es decir que evidenciaron daño celular. Esto nos hace pensar que estos embriones podrían haber sido dañados por el mismo proceso de congelación y descongelación, no permitiendo su viabilidad.

En caso de los embriones vitrificados la mayoría de ellos muestran características de deshidratación en la primera solución de 0.5 M (embriones contraídos), inmediatamente después de la descongelación, poco a poco se rehidratan conforme se produce la remoción del EG y un poco más al pasar a la solución 0.25 M sucrosa y al final del cultivo (Leibo, 2008). Aquellos embriones que presentaron cambios morfológicos anormales, presentaron poca deshidratación e hidratación, finalmente luego del cultivo no reexpandieron; probablemente por daños osmóticos, daño al citoesqueleto y en consecuencia colapso del blastocele.

La tasa de reexpansión embrionaria de embriones congelados *in Vitro* reportada en el presente estudio (57.14%) es menor a las reportadas anteriormente por Palasz *et al.*, 2000 (90 %) y a la de Lattanzi *et al.*, 2002 (63,2 %), 12 y 24 horas, respectivamente. Mientras que la reexpansión de los embriones vitrificados (75%) fue mayor a la registrada por Lattanzi *et al.* (2002) en el mismo trabajo (65,6 %) a las 24 horas de cultivo. Aunque la reexpansión de todos los embriones del estudio no fue total, debido posiblemente al corto período de cultivo, los embriones vitrificados presentaron una mayor tasa de reexpansión, a pesar de que morfológicamente la mayoría de embriones mostraron evidencias de cambios anormales tales como colapso de la CB, presencia de descamación de células o debris celular; y que posiblemente con un mayor tiempo de cultivo hubieran podido restablecerse totalmente, como se ha reportado en blastocistos porcinos luego de 24 hrs. de cultivo (Fabian *et al.*, 2005); observándose una regeneración y aumento del número de células embrionarias. Este aumento de las células durante el cultivo lo atribuyen a la necesidad de reemplazar la gran cantidad de células muertas y extraídas, lo que fuerza a los blastocistos vitrificados a incrementar su actividad mitótica. Los resultados de la evaluación *in Vitro* medido por la reexpansión parcial de los embriones nos indicaría que la vitrificación fue el método que produjo menos daño a las células embrionarias y permitió mejor viabilidad *in Vitro* en comparación al método de congelación lenta

Durante el cultivo *in Vitro* los embriones deben luchar contra el daño oxidativo. El embrión es capaz de expresar genes antioxidantes, cuya expresión depende de la especie y estadio del mismo. Embriones de vacas parecen ser menos capaces que los embriones de ratones

para expresar estos genes (Harvey *et al.*, 1995). Embriones de 9-16 células combaten mejor el estrés oxidativo que cigotos o blastocistos (VanLangendonck *et al.*, 1998). Una estrategia para minimizar el estrés oxidativo es cultivar embriones en un ambiente con atmósferas bajas en O₂ o el uso de moléculas como B-mercaptoetanol, taurina y vitamina E, antioxidantes, también contribuyen a mejorar la calidad de los blastocistos resultantes (de Matos *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2003; Feugang *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2007). Poco se ha estudiado sobre las condiciones ideales que permitan el desarrollo *in Vitro* de embriones de llama hasta el estadio de blastocisto. Se ha reportado que la tasa de sobrevivencia *in Vitro* de embriones de llama post descongelación parece incrementarse conforme el período de cultivo aumenta, y a niveles bajos de O₂ (Lattanzi *et al.*, 2002). Todo esto conllevó a la elección de un período de cultivo post descongelación corto, durante sólo 1 hora, en PBS + 20% SFB, con una atmósfera de 20 % O₂, 5 % CO₂ y 75% N₂, y de esta manera evitar la posibilidad de influencias negativas de un cultivo no adecuado.

Uno de los parámetros mas utilizados para evaluar viabilidad embrionaria *in Vitro* post descongelación en diferentes especies, es la tasa de eclosión de blastocistos (salida del blastocisto de la zona pelúcida); lo que indicaría continuidad en el desarrollo. Se ha observado que blastocistos humanos que no eclosionan alrededor del día 6 tendrían un potencial más bajo de implantación (Khorram *et al.*, 2000). Esta evaluación puede ser confiable siempre que las condiciones ambientales del cultivo (medio de cultivo, concentraciones de gases de gases dentro de incubadora) sean las adecuadas. De esta manera se asegura que una posible muerte celular producida durante el cultivo sea consecuencia del daño que sufrieron los embriones durante la criopreservación,. Este parámetro de evaluación no pudo ser utilizado en el presente trabajo ya que los embriones criopreservados estuvieron en estadio de blastocisto liberado, por tanto, ya habían perdido la zona pelúcida.

Los cambios que suceden en los diferentes estadios de desarrollo embrionario, pueden influir también en su tolerancia a la criopreservación. Un estudio realizado en ratones encontró que la permeabilidad al glicerol y etilenglicol aumentó en el estadio de mórula, lo cual lo atribuyeron a los cambios que sufre el embrión durante este estadio (preparación para la compactación), incrementándose varias actividades fisiológicas (Pedro *et al.*, 2005). En bovinos se evidenció que embriones recuperados al día 7 de hembras superovuladas, los estadios mas tardíos (Blastocistos expandidos) tienen mejor calidad que los menos desarrollados (mórula) produciendo mayores tasas de preñez (Callensen *et al.*, 1995). En otro estudio, embriones bovinos en estadios avanzados exhibieron mejor resistencia a la congelación y sobrevivencia *in Vitro* post-descongelación que los estadios más tempranos, observándose la mayor expansión

embrionaria (93,3 %, 14/15) en el estadio de blastocisto de 7.5 días (Ferre *et al.*, 2002). Ferré *et al.* (2002) obtuvieron buenas tasas de sobrevivencia embrionaria *in Vitro* al utilizar el método de congelación lenta en embriones bovinos en el mismo estadio. En dromedarios (*Camelus dromedarius*) el estadio de blastocisto liberado, fue el ideal para congelar embriones recuperados al día 6,5- 7,0 después de la ovulación (Skidmore *et al.*, 1999). En cabras (Nowshari *et al.*, 1995) y ovejas (Armstrong *et al.*, 1983), se han obtenido mejores tasas de sobrevivencia embrionaria al utilizar la congelación lenta pero en blastocistos y no en estadios más tempranos (mórulas).

La utilización del método de vitrificación para criopreservar embriones en estadios más avanzados también ha reportado resultados alentadores en diferentes especies. En cabras (Chemineau *et al.*, 1986) y en porcinos (Dobrinsky *et al.*, 2000) se reportaron buenas tasas de sobrevivencia embrionaria, en el estadio de blastocisto liberado; Saito *et al.* (1994) tuvieron éxito al vitrificar blastocistos expandidos, pero no así para los estadios de blastocistos tempranos. Por el contrario, en equinos se han obtenido mejores tasas de preñez vitrificando embriones en los estadios de mórula y blastocistos tempranos (Caracciolo di Brieza *et al.*, 2004; Hochi *et al.*, 1994). Los pobres resultados en algunos estudios que han criopreservado embriones más avanzados podría deberse a que estos embriones tienen mayor número de células diferenciadas, implicaría trabajar con células con diferentes características en el tamaño celular, permeabilidad al agua, habilidad para resistir el encogimiento y sensibilidad al efecto de las soluciones. Todo esto haría más variable la respuesta frente a los daños que pudieran producirse durante el proceso, y se requeriría considerar diferentes factores para la optimización de un protocolo adecuado (Mohr y Trounson, 1981).

El diámetro embrionario también podría estar también relacionado al éxito de la criopreservación, ya que embriones más grandes, de mayor volumen y líquido intracelular, tendrían mayor probabilidad de tener incompleta deshidratación durante la criopreservación, con el consiguiente daño celular por formación de hielo intracelular. En equinos no se ha obtenido preñeces al transferir embriones grandes, mayores de 300 μm de diámetro (0/19) (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). En el presente estudio las receptoras preñadas recibieron embriones vitrificados de 280 μm de diámetro en promedio, siendo el diámetro promedio de todos los embriones del experimento $302.27 \pm 16.66 \mu\text{m}$

En llamas embriones en estadios más tempranos, con un menor diámetro, serían los más adecuados para ser criopreservados, ya que un estudio previo en el que blastocistos liberados de alpaca de 7 días, con un diámetro promedio de 450 μm vitrificados y transferidos a

receptoras no produjo ninguna preñez (0/8) (Vásquez *et al.*, 2007). Por el contrario, Skidmore *et al* (2005), reportaron preñez luego de la transferencia de 12 blastocistos de 7 y 8 días post monta; y obtuvieron 8 preñeces de 21 blastocistos de 6 días. Los dos protocolos fueron distintos al utilizado en el presente trabajo, sin embargo, incluyeron las mismas concentraciones de los crioprotectores permeables. Además podemos mencionar que según las observaciones de estudios realizados durante varios años entre la UNMSM-INIA Puno (2004-2008), los embriones de alpacas y llamas de 7 días, en estadio blastocistos liberados, presentaban además de un mayor tamaño una morfología irregular (datos no publicados) y no esférica y homogénea como la que se ha observado en el presente estudio en embriones de 6.5 días. Esto nos hace pensar que los blastocistos liberados de 7 días estarían pasando por un proceso probablemente relacionado al inicio de la elongación e implantación, este hecho confirmaría que el desarrollo embrionario en camélidos sudamericanos es más rápido que otras especies de ganado. Estos reportes justificarían la criopreservación de embriones de llamas no muy grandes en diámetro, en estadio de blastocisto, es decir embriones menores de 7 días post monta. De esta manera se evitaría la formación de cristales de hielo intracelular, por deficiente deshidratación así como el shock osmótico y toxicidad, por elevadas concentraciones de crioprotectores.

Los resultados obtenidos hasta la fecha empleando el método de vitrificación ha reportado resultados alentadores en especies como los bovinos, y recientemente en llamas. Además es una técnica práctica, que no necesita equipos sofisticados como los congeladores programables para un descenso adecuado de la temperatura, los cuales son costosos y muchas veces no se adaptan a las condiciones de la altura en dónde habitan los camélidos sudamericanos. En adición a ello está el hecho de que los embriones de llamas parecen ser especialmente sensibles al enfriamiento (von Baer *et al.*, 2002) al igual que los embriones de porcinos y bovinos por poseer mayor cantidad de lípidos intracelulares (Pereira *et al.*, 2007; Nagashima *et al.*, 1999). Esta característica podría disminuir su tolerancia a los daños causados por la criopreservación, lo que haría que los embriones de camélidos sudamericanos necesiten de un procedimiento de criopreservación que disminuya el tiempo de exposición a temperaturas críticas, como sucede al aplicarse la vitrificación. La información y resultados del presente trabajo nos llevan a pensar que el método de vitrificación sería el adecuado para criopreservar embriones de llama y de otros camélidos sudamericanos.

VI. CONCLUSIONES

- Es posible obtener preñez con el protocolo de vitrificación utilizado, diagnosticado a los 14 días post transferencia a las receptoras.
- El método de vitrificación produjo mayor viabilidad *in Vitro* determinada por el porcentaje de reexpansión comparado con el método de congelación lenta.

VII. RECOMENDACIONES

- Es necesario llevar a cabo trabajos evaluando el efecto de diferentes crioprotectores sobre la viabilidad *in Vivo* de embriones de llama y otros camélidos sudamericanos.
- Continuar evaluando protocolos de vitrificación para embriones de llamas y alpacas, considerando los estadíos y diámetros embrionarios, ya que las características de cada una de ellos pueden influir en la viabilidad de la futura preñez.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aba M, Sumar Y, Kin Dahl M, Forsberg M, Edqvist L. 1998.** Plasma concentration of 15-Ketodihydro-PGF₂ α progesterone oestrone sulphate, oestradiol – 17 β and cortisol during late gestation, parturition and the early post-partum period in llamas and alpacas. *Anim Reprod Sci* 50:111-121.
2. **Aba M, Bravo P, Fosberg M, Kindahl H. 1997.** Endocrine changes during early pregnancy in the alpacas. *Anim Reprod Sci* 47(4): 273-279.
3. **Aba M. 1995.** Studies on the reproductive endocrinology of llamas and alpacas. Swedish University of Agriculture Sciences. Report 12. Uppsala, Sweden. p. 15-50.
4. **Aba M, Forsberg M, Kinvahl M, Sumar Y, Edqvist L. 1995.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Act Vet Sci* 36:489 – 498.
5. **Abe H, Matsukasi S, Hoshi H. 2002a.** Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology* 57: 1273 - 1283.
6. **Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002b.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61: 57-66.

7. **Abd-Elnaeim M, Pfarrer C, Saber A, Abou-Elmagd A, Jones C, Leiser R. 1999.** Fetomaternal attachment and anchorage in the early diffuse epitheliochorial placenta of the camel (*Camellus dromedarius*). Cell Tissue Organ 164: 141 – 154.
8. **Adams G, Dominguez M. 2007.** Pregnancy Diagnosis in Llamas y Alpacas. In: Saunder E, eds. Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2. Chapter 121. University of Saskatchewan. Canada. p. 1088.
9. **Adams G, Ratto M, Huanca W, Singh J. 2005.** Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. Biol Reprod 73: 452-457.
10. **Adams G, Ratto M. 2001.** Reproductive biotechnology in South American camelids. Rev Inv Vet Perú. Suplemento 1: 134 – 141.
11. **Adams C, Bourke D, Kyle C, Young P, McEvoy T. 1992.** Ovulation and embryo recovery in the llama .1st Int Camel Conf. p 125-127.
12. **Adams G, Sumar J, Ginther O. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. Anim Reprod Sci 24:127-138
13. **Adams G, Sumar J, Ginther O. 1990.** Effect of lactation and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J Reprod Fert 90: 535 – 545
14. **Adams G, Griffin P, Ginther O. 1989a.** In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. Biol Reprod 41 (3): 551-558.
15. **Adams C, Moir C, Shiach P. 1989b.** Plasma progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant llamas (*Lama glama*). Vet Rec 125: 618 - 620.
16. **Alarcón V, Sumar J, Riera G. 1990.** Comparison of three methods of pregnancy diagnosis in alpacas y llamas. Theriogenology 34 (6): 1119. 1127.
17. **Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. 2005.** Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNA after fertilization. Mol Reprod Dev 72:281-290.

18. **Aller J, Rebuffi G, Cancino A, Alberico R. 2002.** Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim Reprod Sci* 73: 121 –127.
19. **Amoult C, Zeng Y, Florman H. 1996.** Dependent sperm cation channels regulates acrosomal secretion during fertilization. *J Cell Biol* 134: 637-645.
20. **Aparicio M. 2001.** Efecto de la frecuencia de copulación en alpacas durante el celo post-ovulatorio sobre la mortalidad embrionaria Tesis Bachillerato. Facultad de Medicina Veterinaria. UNMSM. Lima – Perú. 44p.
21. **Arav A, Yavim S, Zerom Y, Natan D, Dekel L, Gacitua H. 2002.** New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinology* 187: 77-81.
22. **Armstrong D, Evans G. 1983.** Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19: 31-42.
23. **Arthur G. 1991.** Reproducción y Obstetricia veterinaria. 1º. ed. México: Interamericana. p 6-8.
24. **Arthur G, Noakes D, Pearson H. 1991.** Reproducción y obstetricia veterinaria. 1º ed. México: Interamericana. p 6-10.
25. **Bakker Y, Baum M. 2000.** Neuroendocrine regulation of GnRH₁ release in induced ovulators. *Neuroendocrinology* 21: 220-262.
26. **Barb C, Barrett J, Kraeling R. 2004.** Role of leptin in modulating the hypothalamic-pituitary axis and luteinizing hormone secretion in the prepuberal gilt. *Domest Animal Endocrinology* 26: 201-214.
27. **Bazet F, Spencer T, Ott T. 1997.** Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Amer J Repro Immun* 37 (6) : 412-420.
28. **Bazer F, Geisert R, Zavy M. 1993.** Fertilization cleavage and implantation. In: Hafez ES, eds. *Reproduction in Farm Animals*. 6ª ed. Philadelphia, Pennsylvania. p 88-212

29. **Bazer F, Vallet Y, Roberts R, Sharp D, Thatcher W. 1986.** Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil* 76(2): 841 – 850.
30. **Bazer FW. 1975.** Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci* 41: 1376-1382.
31. **Bhat K, Mahesh B, Ping L, Chorich L, Wiedmeier V, Brann D. 1998.** Opioid-Glutamate-Nitric Oxide Connection in the Regulation of Luteinizing Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 139 (3): 955-960.
32. **Bennet G, Leymaster J. 1989.** Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine. *J Anim Sci* 6: 1230-1241.
33. **Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. 2000.** Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology* 41: 116-124.
34. **Bettegowda A, Lee K, Smith G. 2008.** Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. *Reprod Fertil Dev* 20:45-53
35. **Bettegowda A, Smith G. 2007.** Mechanism of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Front Biosci* 12:3713-3726.
36. **Birnbaumer L, Sabih N, Rivier J, Vale W. 1985.** Evidence for a physiological role gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116: 1367-1370.
37. **Bleid JD, Wassarman PM. 1983.** Mammalian sperm-egg interaction: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95: 317-324.
38. **Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C. 2008.** Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation and embryonic pattern formation. *Reprod* 135: 181-195.

39. **Blomberg L, Long E, Sonstegard T, Van Tasell C, Bobrinsky J, Zuelke K. 2005.** Serial analysis of gene expression during elongation of the peri-implantation porcine trophectoderm conceptus. *Physiol Genomics* 20: 186-194.
40. **Bo G, Palasz A, Mapletoft R. 2003.** Criopreservación de embriones. In: Ungerfeld RM, eds. Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. Melibea ediciones. 584 p.
41. **Bourke D, Kyle C, Mc Evoy T, Young P, Adams C. 1995.** Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44: 255 - 268.
42. **Bourke D, Adams C, Kyle C, Young P, Mc Evoy T. 1992a.** Superovulation and embryo transfer in the llama. In: First International Camelids Conference. Dubai. p 183 – 185.
43. **Bourke A, Adams G, Kyle C. 1992a.** Ultrasonography as aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet Rec* 130: 424 – 428.
44. **Boutron P, Peyridieu J. 1994.** Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2,3 butandiol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. *Cryobiology* 31: 367-373.
45. **Bowen J, Burghardt R. 2000.** Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11 (2): 93-104.
46. **Bravo P, Mayta M, Ordoñez C. 2000.** Growth of the conceptus in alpacas. *Anim Vet Res* 61:1508 – 1511.
47. **Bravo PW. 1997.** Ovarian function in domesticated South American camelids. In: Current therapy in large animal Theriogenology. Edit Younquist, R. Vol II. Saunders Company Philadelphia. p 803 – 806.
48. **Bravo N, Valera M. 1993.** Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci* 32: 245-252.
49. **Bravo W, Stabenfeldt G, Lasley B, Fowler M. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American Camelids. *Biol Reprod* 45:553-559.

50. **Bravo W, Fowler M, Stabenfeldt G, Lasley B. 1990.** Ovarian follicular dynamics in the Llama. *Biol Reprod* 43: 579 – 585.
51. **Bravo P, Sumar J. 1989.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim Reprod Sci* 21:271-281.
52. **Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. 2002.** Integrins and extracellular matrix proteins and the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cell Tissue Organ* 172:202-217
53. **Byskov A. 1986.** Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiologic Rev* 66: 71 – 117.
54. **Byskov A, Hoyer P. 1994.** Embryology of Mammalian Gonads and Ducts. In: Knobil E, Neill R, eds. *The Physiology of Reproduction*. 2º ed. Raven Press. New York. p 487 – 515.
55. **Callensen H, Lovendahl P, Bak A, Greve T. 1995.** Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sic* 73: 1539 – 1543.
56. **Callensen S, Greve T, Hytell P. 1986.** Preovulatory endrocrinology and oocyte maduration in superovulated cattle. *Therigenology* 25: 71-78.
57. **Canfield R, Sniffen C, Butler W. 1990.** Effects of excess degradable protein on post-partum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J Dairy Sci* 73(9): 2342-2349.
58. **Caracciolo Bi Brieza V, Squires E, Zicarelli L, Carnevale E. 2004.** Establishment of pregnancies alter vitrification of equine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 16:165 (abstract 88).
59. **Cardenas H, Trout W, Simmen R, Pope W. 1997.** Short-term effects of exogenous estradiol-17 beta on blastocyst development during the period of enlongation in swine. *Anim Reprod Sci* 47: 123-135.
60. **Celestinós M, Gatica R. 2002.** Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch Med Vet* 34: 157 –165.

61. **Cervantes M. 2008.** Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico. Ms. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p 77.
62. **Cervantes M, Huanta W, Huanta T. 2007.** Efecto del estadio del desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación y supervivencia embrionaria en alpacas. Rev Inv Vete Perú 18 (2): 271-281.
63. **Cervantes M. 2004.** Estudio del Efecto del Estadio del desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional mayor de San Marcos. 62 p.
64. **Cervera R, García-Ximénez F. 2003.** Vitrification oz zona-free rabbit expanded or hatching blastocysts: a possible model for human blastocysts. Human Reprod 18 (10): 2151-2156.
65. **Cocero M, Moreno S, Aguilar B. 2000.** Ultraestructure of *in Vivo*-produced sheep embryos after cryopreservation in glicerol or ethilene glicol. Theriogenology 53: 250-256.
66. **Cordero A, Huanca T, Gonzalez M, Cárdenas O, Vásquez M, Huanca W. 2006.** Perfiles de Progesterona y pérdidas embrionarias en Alpacas (*Vicugna Pacos*). (CD-Room). XVII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. 6-8 Septiembre. Cajamarca –Perú.
67. **Chaves M, Aba M, Agüero A, Egey J, Berestín B, Rutter B. 2002.** Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. Anim Reprod Sci 69: 37–46.
68. **Chemineau P, Procureur R, Coynie J, Lefevre P, Locatelli A, Chupin D. 1986.** Production, freezing and transfer of embryos from bluetongue – infected goat herd without bluetongue transmission. Theriogenology 26: 279 -290.
69. **Cuello C, Sánchez J, Albiñana C, Gil M, Peral M, Lucas X, Roca J, Vazquez J, Martínez E. 2008.** Effect of the cryoprotectant concentration on the *in Vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. Cryobiology 56:189-194.

70. **Cui X, Song H, Kim M. 2005.** Identification of metaphase II specific gene transcripts in porcine oocytes and their expression in early stage embryos. *Reprod Fertil Dev* 17: 625-632.
71. **De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferri ML, Iona S, Lobascio M. 2005.** Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod BioMedicine* 10 (2): 182-191.
72. **Delhon G, Lawzewitsch I. 1987.** Reproduction in the male llama (*Lama glama*), a South American Camelid: Spermatogenesis and organization of the intertubular space of the mature testis. *Acta Anat* 129: 59-66.
73. **Del Campo M, Del Campo C, Ginther O. 1996.** Vascular provisions for a local utero – ovarian Cross-over path way in new World camelids. *Theriogenology* 46 (6): 983-991.
74. **Del Campo M, Del Campo C, Adams G, Mapletoft R. 1995.** The application of new reproductive Technologies to South American camelids. *Theriogenology* 43:21-30.
75. **Dieleman S, Bever M. 1987.** Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/ Pg – treated cows. *J Reprod Fertil* 81: 533.
76. **Diskin M, Sreenan J. 1980.** Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 59:463-468
77. **Dobrinsky J. 2002.** Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57:285-602.
78. **Dobrinsky J, Pursel V, Long C, Johnson L. 2000.** Birth of piglets after of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Bio Reprod* 62: 564 – 570.
79. **Dochi O, Takakura H, Imai K. 1990.** Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification Japanese. *J Anim Reprod* 36: 69-72.
80. **El-Danasouri HS. 2001.** Successful pregnancies and deliveries after a simple vitrification protocol for day 3 human embryos. *Fertil Steril* 76 (2): 400-402.

81. **Eldridge-Panuska W, Caracciolo di Brieza V, Seider Jr G, Squires E, Carnevale E. 2005.** Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 63: 1308-1319.
82. **England B, Foote W, Matthews D, Cardozo A, Riera S. 1969.** Ovulation and corpus luteum formation in the llama (*Lama glama*). *J Endocrinol* 45: 505-513.
83. **Fabian D, Gjorret J, Berthelot F, Martina-Botté F, Maddox P. 2005.** Ultrastructure and cell death of *in Vivo* derived and vitrified porcine blastocyst. *Mol Reprod Dev* 70: 155-165.
84. **Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cotell D, Hytell P, Ward F, Boland M. 2001.** Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 58: 186-195.
85. **Ferguson J, Chalupa W. 1989.** Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci* 72 (3):746-766.
86. **Fernández Baca S. 1993.** Manipulation of reproductive function in male and female New World camelids. *Anim Reprod Sci* 33: 307.-323.
87. **Fernández Baca S, Hansel W, Cuatman S, Sumar Y, Novoa C. 1979.** Differential Lutelytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biol. Reprod.* 20: 586-595. En: Libro de Res. Proyectos de investigación realizados por UNMSM (1975 - 1979). Tomo II. p 100.
88. **Fernández Baca S, Sumar Y, Novoa C. 1975.** Actividad funcional del ovario y cuerno uterino en la alpaca. V Reunión Anual ALPA. Venezuela. En: Libro de Res. De Proyectos de investigación realizados por UNMSM. (1975-1979) Tomo II. p 99.
89. **Fernández Baca S. 1971.** La Alpaca. Reproducción y crianza. Boletín N° 7 IVITA. Universidad Nacional Mayor de San Mayor. Lima 43 p.
90. **Fernández Baca S, Madden D, Novoa C. 1970a.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fertil* 22:261-267.

91. **Fernández Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970b.** Embrionic modalito in the Alpaca. Biol Reprod 3 (2): 243-251.
92. **Fernández Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970c.** Corpus luteum function in alpaca. Biol Reprod 3: 252 – 261.
93. **Ferré L, Kaiser G, Canodeville J, López N, Aller J, Palma G, Alberio R. 2002.** Effect of age and stage of embryo development on post – cryopreservation embryo survival of *in Vitro* bovine embryos. Theriogenology 57(1): 301-306.
94. **Flechon J, Guillomot M, Charlier M, Flechon B, Martal J. 1986.** Experimental studies on the enlogation of the ewe blastocyst. Reprod Nutr Dev 26:1017-1024.
95. **Florman HM, Arnoult C, Kazam I, Li C, O'Toole, C. 1999.** An intimate biochemistry; egg-regulated acrosome reactions of mammalian sperm. Adv Biochem 5: 147-233.
96. **Fortune JE. 1994.** Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod 50: 225-232.
97. **Fowler M, Olander H. 1990.** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). Anim Vet Res 51: 1495-1500.
98. **Fowler M. 1989.** Medicine and surgery of South American Camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco. Iowa State University Press, Iowa.
99. **Fuchinoue F, Fukunaga N, Chiba S, Nakajo Y, Yagi A, Kyono K. 2004.** Freezing of human immature oocytes using cryoloops with taxol in the vitrification solution. J Assis Reprod Gen 21 (8): 307-312.
100. **García M, Amstalden M, Williams S, Stanko R, Morrison C, Keisler D, Keisler S, Nizielski S, Williams G. 2002.** Serum leptin and its adipose gone expression durin g pubertad development, the estrodes cycle, and different season in cattle. J Anim Sci 80:2158-2167.

101. **Genicot G, Leroy J, Soom A, Donnay I. 2005.** The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 63 (4): 1181 - 1194
102. **Ginther O, Bergfelt D, Kulick L, Kot K. 1997.** Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* 50 (4): 507 - 519.
103. **Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989.** Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 87:223-230.
104. **Gondos B. 1980.** Development and differentiation of the testis and male reproductive tract. In: Steinberger A, Steinberger E, eds. *Testicular Development, Structure and Function*. New York: Raven Press. p 3 – 20.
105. **Gray C, Burghardt R, Johnson G, Bazer F, Spencer T. 2002.** Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and enlongation. *Reprod* 127: 289-300.
106. **Grier H. 1992.** Chordate testis: The extracelular matriz hipótesis. *J Exp Zool* 261:151-160.
107. **Guillomot M, Turbe A, Hue I, Renard J. 2004.** Staging of ovine: embryos and expression of the I-box genes *Brachyury* and *tomesodermin* around gastrulation. *Reprod* 127: 491-501.
108. **Guillomot M. 1995.** Cellular interactions during implantation in domestic ruminant. *J Reprod Fertil Suppl* 49:39-51.
109. **Guillomot M, Michel C, Gaye P, Charlier N, Trojan J, Martal, J. 1990.** Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. *Bio Cell* 68: 205-211.
110. **Hafez E. 1996.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6ª ed. México: Interamericana McGraw – Hill. 525 p.

111. **Hansen T, Austin K, Perry D, Pru J, Teixeira M, Jonhson G. 1999.** Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 54:329-339.
112. **Hasler J. 2001.** Factors affecting frozen and frish embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401 – 1415.
113. **Heyman Y, Camous S, Fevre J, Meziou W, Martal J. 1984.** Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. *J Reprod Fertil* 70: 533-540.
114. **Hill J, Lamond D, Hendricks D, Dickey J, Niswender G. 1970.** The effect of under nutrition on ovarian function and fertility in beef heifers. *Biol Reprod* 2: 78-84.
115. **Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor R. 1995.** Association between p34 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* 3: 325-332.
116. **Hochi S, Fujimoto T, Oguri N. 1995.** Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod Fertil Dev* 7:113-117.
117. **Hochi S, Fujimoto T, Baun J, Oguri N. 1994.** Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 42: 483-488.
118. **Huanca W. 2005a.** Aplicación de Biotecnologías en el mejoramiento genético de llamas y alpacas. Fase I: Desarrollo y evaluación de un protocolo de transferencia de embriones. CSI. Boletín 55. Lima, Perú. pag 8-12.
119. **Huanca, W. 2005b.** Aplicación de Biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de Camélidos Sudamericanos. *Uruguay-Agrociencia*. Vol IX (1-2): 505-509.
120. **Huanca W, Ratto M, Santiani A, Cordero A, Huanca T. 2004.** Embryo transfer in camelids: study of a reliable superovulatory treatment in llamas. In: 15th Internacional Congress on Animal Reproduction. Brazil

121. **Huanca W, Cardenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams G. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet Peru (Supl)* 1:462-463.
122. **Hue I, Degrelle S, Campton E, Renard J. 2007.** Gene expresión in enlongation and gastrulating embryos from Rumiants. *Soc Reprod Fertil* 64: 365-377.
123. **Hunt J, Petroff M, Burnett T. 2000.** Uterine leucocytes: Key player in pregnancy. *Semin Cell Dev Bio* 11:127-137.
124. **Illera M. 1994.** Sistema reproductivo del macho y su control endocrino. In: Reproducción de los animales domésticos. Cáp. 4. Barcelona – España: AEDOS ediciones. p 97 – 129.
125. **International Embryo Transfer. 1998.** Manual of the International ET society. 3rd ed. Savoy. IL, USA.
126. **Jain J, Paulson R. 2006.** Oocyte cryopreservatio. *Fertil Steril* 86 (4): 1037 - 1046
127. **Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J, Tilly J. 2004.** Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150.
128. **Jonson G, Burghardt R, Spencer T, Newton G, Ott T, Bazer F. 1999.** Ovine osteopontin II. Osteopontin and α v β 3 integrin expresión in the ovine uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 61: 892-899.
129. **Jonson L. 1989.** Llama reproduction. *Vet. Clinic North American Food. Anim Pract* 5: 159 – 182.
130. **Jungnickel M, Marrero H, Bimbaumer L, Lemos J, Florman H. 2001.** Trp2 regular's entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg Zp3. *Nat Cell Biol* 5: 499-502.
131. **Kaidi S, Bernard P, Lambert A, Massip A, Dessy F, Donnay I. 2001.** Effect of conventional controlled-rate freezing a vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *inVtro*. *Biol Reprod* 65:1127-1134.

132. **Kaidi S, Van Langendonekt A, Massip A, Dessy F, Donnay J. 2001.** Cellular alterations alter dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of *in Vitro* produced bovine embryo. *Theriogenology* 52: 515-525.
133. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh I. 1995.** Manual of bovine embryo transfer. Japan Livestock Technology Association. 122 p
134. **Kasai M. 1996.** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci* 42: 67-75.
135. **Kasai J, Komi A, Takakomo H, Tsudera T, Sakurai T, Machida T. 1990.** A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89:91-97.
136. **Kimber S. 2000.** Cell biology of implantation and placentation. *Semin Cell Dev Bio* 11:61-65.
137. **Kimber S, Bentley J, Ciemerych M, Moller C, Bock E. 1994.** Expresión of N-CAM in fertilizad pre and Perú – implantation and parthenogenetically activated Mouse embryos. *Eur Cell Biol* 63: 102 – 113.
138. **King W. 1990.** Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. In: McFeely RA, eds. *Advances in veterinary Science and Comparative Medicine* 34: Domestic Animal Cytogenetics. Academic Press Inc. San Diego. USA. p 229.
139. **Knight T, Ridland M, Scout I, Death A, Wyeth T. 1995.** Foetal mortality at diferente stages of gestation in alpacas (*Lama pacos*) and the associated changes in progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci* 40: 89-97.
140. **Khorram O, Shapiro S, Jones J. 2000.** Transfer on not assisted hatched and hatching human blastocysts after *in Vitro* fertilization. *Fertil Steril* 74: 163-165.
141. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. 2005.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11: 300-308

142. **Lamming G, Wathes D, Flint A, Payme Y, Stevenson K, Vallet Y. 1995.** Local action of the aproblast interferon in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J Reprod Fertil* 105 (1): 165- 175.
143. **Lang F, Busch G, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E. 1998.** Functional significance of cell volume regulatory mechanism. *Physiol Rev* 78: 247-305.
144. **Larson R, Ignatz G, Currie W. 1992.** Effect of fibronectin on early development in cows. *J Reprod Fertil* 96: 289-297.
145. **Lattanzi C, Santos C, Chaves G, Miragaya M, Capdevielle E, Judith E, Agüero A, Baranao L. 2002.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 57 (1): 585
146. **Latham K, Schultz R. 2001.** Embryonic genome activation. *Front Biosci* 6:D748-D759.
147. **Lee R, Wheeler T, Peterson A. 1998.** Large format, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ovine periimplantation uterine luminal fluid proteins: identification of aldose reductase, cytoplasmic actin, and transferrin as conceptus-synthesized proteins. *Biol Reprod* 59:743-752.
148. **Leese, H; Hugentobler, S; Gray, S; Morris, D; Sturmey, R; Whitear, S and Sreenan, J. 2008.** Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the Developmental Origins of Health and Disease. *Reprod Fertil and Develop.* 20, 1-8.
149. **Leibo S. 2008.** Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 69, 37-47.
150. **Leibo S. 1984.** A one step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790
151. **Leibo S. 1977.** The freezing of mammalian embryos. In: Elliott K, Whelan J, eds. *CIBA Foundation Symposium*. Elsevier/Excerpta Medica. p. 125-127.

152. **León Y, Smith B, Tiemm K, Le Cren G. 1990.** Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). J Reprod Fertil 88 (2): 503-511.
153. **Leyva V, García M. 2000.** Efecto del estradiol (E₂) en la fertilización y sobrevivencia embrionaria en alpacas. En: XV congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Resumen. Cusco. 22-23.
154. **Leyva V, García W. 1999a.** Efecto de la progesterona exógeno sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 87
155. **Leyva V, García W. 1999b.** Efecto de la GnRH sobre la fertilización y sobre vivencia embrionaria en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 90.
156. **Leyva V, García W. 1999c.** Efecto de la progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 89.
157. **Lieman P. 1991.** Comparison of various cryopreservation media for vitrification of 7-day bovine embryos. Med Vet Pract 36: 586-592.
158. **López A. 2004.** Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal proveniente de llama, alpaca y bovino. Tesis para optar el Título de Medico Veterinario - UNMSM-FMV. Perú. 41pp.
159. **Ludeña H. 1979.** Influencia de la flora bacteriana cuantitativa vaginal sobre la fertilidad en alpacas. En: Libro de Resúmenes de Proyectos de investigación realizados por UNMSM (1975-1979). Tomo II. p 240.
160. **Lussier J, Matton P, Dufour J. 1987** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J Reprod Fertil 81: 301 – 307.

161. **Maddox-Hyttel P, Alexopoulos N, Vajta G, Lewis I, Rogers I, Cann L, Callesen H, Tveden N, Trounson A. 2003.** Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reprod* 125: 607-623.
162. **Mann G, Fray M, Lamming G. 2006.** Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet J* 171: 500-503.
163. **Mann G, Lamming G. 2001.** Relationship between maternal endocrine environment early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reprod* 121:175-180.
164. **Mann G, Lamming G.1999.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domest Anim* 34:269-274.
165. **Martínez A, Valcárcel A, De las Heras M, Matos F, De Matos D, Furnus C, Brogliatti G. 2002.** Vitrification of in vitro produced bovine embryos: *in Vitro* and *in Vivo* evaluations. *Anim Reprod Sci* 73: 11 - 21.
166. **Martino A, Songsasen N, Leibo P. 1996.** Development into Blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. *Bio Reprod* 45: 1059-1069.
167. **Matzuk M, Burns K, Viveiros M, Eppig J. 2002.** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296: 2178-2180.
168. **Mazur P. 1966.** Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 2(4):181-192.
169. **Men H, Agca Y, Mullen S. 2005.** Osmotic tolerant of *in Vitro* produced porcine blastocysts assessed by their morphological integrity and cellular actin filament organization. *Cryobiology* 51: 119-129.
170. **Michael D, Alvarez I, Ocon O, Powell A, Talbot N, Johnson S, Ealy A. 2006.** Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon-tau production in bovine trophectoderm. *Endocrinology* 147: 3571-3579.
171. **Milligan S. 1982.** Induced ovulation in mammals. *Rev Reprod Biol*.4:1.

172. **Miragaya M, Aba M, Capdevielle F, Ferrer M, Chaves M, Rutter B, Agüero A. 2004.** Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology* 61 (4):663-671.
173. **Miragaya M, Chaves M, Agüero A. 2006.** Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Small Ruminant Res* 61: 299-310.
174. **Misirlioglu M, Page G, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish J, First N, Memili E. 2006.** Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 18905-18910.
175. **Modlinski J. 1970.** The role of the zone pellucida in the development of mouse eggs *in Vivo*. *J Embryol* 23: 539-547.
176. **Monniaux D, Chupin D, Saumande J. 1983.** Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19 (1), 55–81.
177. **Morh L, Trounson A. 1981.** Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Bio Reprod* 25: 1009-1025.
178. **Mortillo S, Wassarman P. 1991.** Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Dev* 113: 141-149.
179. **Motlik J, Crozet N, Fulka S. 1984.** Meiotic competence *in Vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 72: 323-328.
180. **Nagashima H, Cameron R, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw A, Nottle M. 1999.** Survival of porcine delipated oocytes and Embryos after cryopreservation by Freezing or vitrification. *J Reprod Dev* 45 (2):167-176.
181. **Nebb R, Royal M, Gong Y, Garnsworthy P. 1999.** The influence of nutrition on fertility. *Cattle Pract* 7: 227- 234.

182. **Nestler, J. 1993.** Sex hormone-binding globulin: a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance. *J clin Endocrinol Metab* 76 (2): 273-274.
183. **Niemann H. 1991.** Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35: 109-124
184. **Nowshari M, Ali S, Saleem S. 2005.** Offspring resulting from transfer of cryopreserved embryos in camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 63: 2512 – 2522.
185. **Nowshari M, Brem G. 2001.** Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on development of mouse pronuclear stage embryos. *Hum Reprod* 16: 2368-2373.
186. **Nowshari M, Holtz W. 1995.** *in Vitro* cultured of goat morula to blastocysts before freezing. *Theriogenology* 44: 983 – 988.
187. **Novoa C, Leyva V. 1996.** Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica. *IVITA* 26 (30): 3-18.
188. **Novoa C. 1992.** Reproducción de camélidos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev Cienc Vet* 8 (4): 9-11.
189. **Novoa C. 1991.** Fisiología de la Reproducción de la Hembra. En: Fernández Baca S, eds. *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Cap III. Santiago. 99 p.
190. **Novoa C. 1986.** Reproduction of llamas and alpacas. *Convenio CIIA Canada / IVITA UNMSM. Revista de Camélidos* 1. p 5-12.
191. **O'Farrel K, Langley O, Arraigan P. 1983.** Fertilization and embryonic survival rates in dairy cow culled as repeat breeders. *Vet Rec* 112:95-97.
192. **Olivera L, Zago D, Jones C. 2003.** Developmental changes at the materno – embryonic interface in early pregnancy of the alpaca (*Lamos pacos*). *Anat Embryol* 207: 317-331.
193. **Oxender W, Colenbrander B, Van de Wiel D, Wensing C. 1979.** Ovarian Development in Fetal and Pubertal Pigs. *Biol Reprod* 21: 715 – 721

194. **Palasz A, Adams G, Brogliatti G, Mapletofi R. 2000**, Effect of collection and of permeating cryoprotectants on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. Theriogenology 53 (1): 341.
195. **Palomino M, Li O. 2000**. Congelación de embriones. In: Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. Edit. Importadores SA. 256 p.
196. **Palomino M, Avila E, Tabacchi L. 1987**. Estudio Clínico del parto en alpacas y llamas. Rev Camel Sud 9: 18-27.
197. **Pan G, Chen Z, Liux Li D, Xie Q, Ling F, Fang L. 2001**. Isolation and purification of the ovulation – inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). Theriogenology 55: 1863 – 1879
198. **Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade P, Quinn K, Boland M, Lonergan P. 2002**. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in Vivo* or *in Vitro* produced ovine blastocysts. Anim Repro Sci 74 (1-2): 35-44.
199. **Parraguez V, Cortez S, Gazitua F. 1997**. Early pregnancy diagnosis in alpaca (*Lama pacos*) and llama (*Lama glama*) by ultra as ound. Anim Reprod Sci 47: 113 – 121.
200. **Payer B, Saitou M, Barton S, Thresher R, Dixon J, Zahn D, Colledge W, Carlton M, Nakano T, Surani M. 2003**. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. Curr Biol 13: 2110-2117.
201. **Paynton B, Rempel R, Bachvavora R. 1988**. Changes in states of adenylation and time course of degradationof maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. Dev Biol 129:304-314.
202. **Pedro P, Yokoyama E, Zhu S, Yoshida N, Valdez D, Tanaka M, Dashing K, Kasai M. 2005**. Permeability of Mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. J Reprod Dev 51: 235-246

203. **Pereira R, Marques C. 2008.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Banking. Review paper.
204. **Rall W, Schmidt P, Lin X, Brown S, Ward C, Hansen C. 2000.** Factors affecting the efficiency of cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. ILAR J 41:207-213.
205. **Rall W. 1987.** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24: 387 – 402.
206. **Rall W, Meyer T. 1986.** Fracture damage to de zonae of mammalian embryos cryopreservation and its avoidance. Cryobiology 23: 557-558
207. **Rall W, Fahy G. 1985a.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 313: 573- 575.
208. **Ratto M, Adams G. 2007.** Embryo Technologies in South American Camelids. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2. Chapter 123. 2nd. Ed. Saunders, Elsevier. p. 1088.
209. **Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams G. 2006.** Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. Animal Reprod Sci 91 (3-4): 299 - 306.
210. **Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. 2005.** *in Vitro* and *in Vivo* maturation of llama oocytes. Theriogenology 63: 2445 – 2457.
211. **Ratto M. 2005.** Ovarian Follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. PhD Thesis. University of Saskatchewan - Saskatoon, Canada. 168 p.
212. **Ratto M, Singh J, Huanca W, Adams G. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. Theriogenology 60: 1645-1656.

213. **Raub T, Bazer F, Robert R. 1985.** Localization of the iron transport glycoprotein, uteroferrin, in the porcine endometrium and placenta by using immunocolloidal gold. *Anat Embryol* 171: 253 – 258.
214. **Remsen L, Roussel J, Karihaloo A. 1982.** Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 18 (3):365-372.
215. **Rivera-Pérez J, Magnunson T. 2005.** Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of *Brachyury* and *Wnt3*. *Dev Biol* 288: 363-371.
216. **Robinson R, Fray M, Wathes D, Lamming D, Mann G. 2006.** *in Vivo* expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev* 73 (4):470-474.
217. **Ross J, Ashworth M, Hurst A, Malayer J, Geisert R. 2003.** Analysis and characterization of differential gene expression during rapid trophoblastic elongation in the pig using suppression subtractive hybridization. *Repro Biol Endocrinol* 1:23-34
218. **Rutter B. 2008.** Programa de Entrenamiento sobre manejo reproductivo de Vacas lecheras. Red de información y capacitación agropecuaria. PERULACTEA. Lima- Perú.
219. **Saha S, Otoi T, Takagi M, Bowdon A, Sumantri C, Suzuki T. 1996.** Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33: 291-299.
220. **Saito N, Imai K, Tomisawa M. 1994.** Effect of sugars – addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 41: 1053 – 1060.
221. **San Martín M, Capoeira M, Zunigra J. 1968.** Aspect of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 16: 345 – 399.
222. **Scheffen B, Van Der Zwahlen P, Massip A. 1986.** A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-letters* 7:260-269.
223. **Schneider U, Mazur P. 1984.** Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen – thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.

224. **Schwartz M, Schaller M, Ginsberg M. 1995.** Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Anim Rev Cell. Dev Biol* 11: 549 – 559.
225. **Seidel GE, 2006.** Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65:228-235.
226. **Silva W. 1994.** Embryonic mortality and repeat breeder cows. In: Jordan ER, eds. *Proceeding National Reproduction Symposium*. Pittsburgh. Texas A&M University. p. 151.
227. **Skidmore J, Billah M, Loskutoff N. 2004.** Developmental competence *in Vitro* and *in Vivo* of cryopreserved, hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Reprod Fertil Dev* 16:605-609.
228. **Skidmore J, Loskutoff N. 1999.** Developmental competence *in Vitro* and *in Vivo* of cryopreserved expanding blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 51:293-297
229. **Skidmore J, Starbuck G, Lamming G, Allen W. 1998.** Control of luteolysis in the one – humped (*Camelus dromedarius*). *J Reprod Fertil* 114 (2): 201 – 209.
230. **Skidmore J, Wooding F, Allen W. 1996.** Implantation and early placentario in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Placenta* 17: 253 – 262.
231. **Skidmore J, Allen W. 1994.** Estrogen synthesis by the Peru-implantation conceptus of the one – humped camel (*Camelus dromedarius*) *J Reprod Fertil* 101: 362 – 267.
232. **Smitz J, Cortvrindt R. 2002.** The earliest stages of folliculogenesis *in Vitro*. *Reprod* 123: 185 – 202.
233. **Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarin M. 2007.** Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* 19: 65-78.

234. **Spencer TE, Bazer FW. 2004.** Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2:49-50.
235. **Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. 2004a.** Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod* 82-83: 537-550.
236. **Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. 2004b.** Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reprod* 128:657-668.
237. **Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. 2004c.** Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Bio Reprod* 71:2-10.
238. **Spencer TE, Bazer FW. 2002.** Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 7: 1879-1898.
239. **Spencer T, Ott T, Bazer F. 1996.** Interferon - tau: pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 215-229.
240. **Steven D, Burton G, Sumar J, Nathanielsz P. 1980.** Ultrastructural observation on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). *Placenta* 1: 21-32.
241. **Stevenson Y. 1997.** Clinical reproductive physiology of the cow. In: *Current Therapy in large animal. Theriogenology I (Suppl)*. 257-267
242. **Stewart M, Thiel M, Mogg N. 1995.** Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 7: 640 – 696.
243. **Su Y, Sugiura K, Woo Y, Wigglesworth K, Kamdar S, Affourtit J, Eppig J. 2007.** Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 302: 104-117.
244. **Suarez, S. 2006.** Gamete and Zygotes transport. In: Neill, J eds. *Physiology of Reproduction*. Vol 1. (CD-ROM). 3rd ed. USA: Elsevier Academic Press. 3269 p.

245. **Sumar J. 2000.** Llamas and Alpacas. In: Hafez ESE, eds. Reproduction in farm animals. 7^a ed. USA: McGraw-Hill. p 218-228.
246. **Sumar J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Memorias del I Simposium Internacional Avances en Reproducción de rumiantes. Lima. p 30-44.
247. **Sumar J, Adams G. 1997** In: Saunder E, eds. Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2. Chapter . University of Saskatchewan. Canada
248. **Sumar J. 1993.** Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. IVITA. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Rev Inv Pec 6 (1): 17-21.
249. **Sumar J, Alarcón V. 1989.** Estímulo coital y fertilidad en alpacas. En: Libro de Res. XII. Reunión Científica APPA. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. p 67.
250. **Sumar J, Fredricksson G, Alarcón V, Kindahl H, Edqvist L. 1988.** Levels of 15 – keto 13, 14 dihydro – PFG 2 α , Progesterone and Oestradiol – 17 β after induced ovulations in llamas and alpacas. Acta Vet Scand 29 (3-4): 339 – 346.
251. **Sumar J, Bravo W, Foot W. 1987.** Estrotes intensity, time and occurrence of ovulation in alpaca. Utah State Univer. USA. Improv Reprod Perform 14: 12-16
252. **Sumar J, Leyva V. 1979.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la llama (*Lama glama*). Congreso Internacional sobre camélidos sudamericanos. Río negro Argentina. En: Resúmenes Proyectos Investigación realizadas por la UNMSM. 1975 – 1979. tomo II. p 124.
253. **Sumar J. 1971.** Contribution of the radioimmunoassay technique to knowledge of the reproductive physiology of South American Camelids. In isotope and related techniques in Animal Production and Health. Viena, Austria: FAO/IAEA. p 353-379.
254. **Tanaka H, Ballarales P, Masaka J, Kanagawa H. 1997.** Fecundación *in Vitro*. En: Teoría y práctica de la fecundación *in Vitro*. Cap V. JICA. Temuco-Chile.

255. **Telford N, Watson A, Schultz G. 1990.** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26: 90-100.
256. **Thompson E, Legouy E, Renard J. 1998.** Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development. *Dev Genet* 22: 31-42.
257. **Thomas PQ, Beddington RS. 1996.** Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Current Biology* 6: 1487-1496
258. **Tong Z, Gold L, De Pol A, Vanevski K, Dorward H, Sena P, Palumbo C, Bondy C, Nelson L. 2004.** Developmental expression and cellular localization in mouse MATER, an oocyte specific protein essential for early development. *Endocrinology* 145:1427-1434.
259. **Tong Z, Gold L, Pfeifer K, Dorward H, Lee E, Bondy C, Dean J, Nelson L. 2000.** Mater a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 26: 267-268.
260. **Vajta G. 2000.** Vittrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 60: 357 – 364.
261. **Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P, Jacosen H, Greve T, Callensen H. 1998.** Open Pulled Straw (OPS) vittrification, in straw direct rehydration and culture. *Mol Reprod Dev* 51:53-58.
262. **Vajta G, Hyttel H, Callensen D. 1997.** Morphological changes of *in Vitro* produced bovine blastocysts after vittrification, in straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev* 48: 9-17
263. **Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Cárdenas O, Huanca T, Huanca W. 2007.** Vittrificación de embriones de alpacas: Estudio Preliminar. APPA_ALPA. Cusco-Perú

264. **Vásquez M. 2005.** Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular de las diferentes fracciones de plasma seminal proveniente de llamas. Tesis para optar el Título de Medico Veterinario - UNMSM-FMV. Perú. 52 pp
265. **Vaughan J, MacMillan K, D'Occhio M. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Reprod Sci* 80 (4):353-361.
266. **Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003.** Artificial Insemination in Alpacas (*Lama pacos*). In: A report for the rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC. p. 90.
267. **Vaughan T, James P, Pascall J, Brown K. 1992.** Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EFG receptor during early pig development. *Development* 116: 663-669.
268. **Viebahm C, Stortz C, Michell S, Blum M. 2002.** Low proliferative and high migratory activity in the area of *Brachyury* expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 129: 2355-2365.
269. **Viebahm C, Mayer B, Hrabe de Angelis M. 1995.** Signs of the principal body axes prior to primitive streak formation in the rabbit embryo. *Anat Embryol* 192:159-169
270. **Von Baer A, Del Campo M, Donoso X, Toro F, Von Baer L, Montecinos S, Rodríguez-Martínez, H, Palasz A. 2002.** . Vitrication and cold storage of llama (*Lama glama*) hatched blastocysts. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Parana, Brazil. *Theriogenology* 57 (1): 489.
271. **Watanobe H. 2002.** Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate ganadotropin releasing hormone secretion *in Vivo* in rats. *J Physiol* 545: 255-268.
272. **Wassarman P. 2003.** Fertilization. *ChemTracts-Biochem. Mol Biol* 16: 117-204.
273. **Wassarman P. 1999.** Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175-183.
274. **Wassarman P. 1990.** Profile of a mammalian sperm receptor. *Dev* 108: 1-17.

275. **Wassarman, P. 1988.** Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57: 415-442.
276. **Whitaker D, Smith E, Da Rosa G, Kelly M. 1993.** Some effects of nutrition and management on the fertility of dairy cattle. *Vet Rec* 133. 61.
277. **Whittingham D, Leibo S, Mazur P. 1972.** Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 °C. *Science* 4: 178-411.
278. **Wooding FB. 1992.** Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants, binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13:101-113
279. **Wooding FB. 1984.** Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat* 170:223-250.
280. **Young K, Kraeling R, Bazer F. 1989.** Effects of prolactin on conceptus survival and uterine secretory activity in pigs. *J Reprod Fertil* 86 (2): 713-722.
281. **Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. 2001.** Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reprod* 121: 447-454.
282. **Zieba D, Amstalden M, Morton S, Maciel M, Keisler D, Williams G. 2004.** Regularity roles of leptin at the hypothalamic Hypophyseal Axis before and after sexual maturation in cattle. *Biol Reprod* 71: 804 – 812.

IX. ANEXOS

ANEXO 01. Antecedentes reproductivos de hembras donadoras

Nº Donadora	Nº arete	Características	Nº partos anteriores	Fechas de partos					Identificación de machos que las montaron-2008		
107	1700300	Chaku café	1	01/02/05					175201	15198	
130	21102	Chaku gris manchada	2	05/02/06	02/02/07				770200	210203	
132	218301	Chaku negra	3	25/01/04	11/02/05	30/03/07			175201	15198	
133	570100	Q´ara café	3	24/01/03	05/03/05	02/03/06			70105	02--99	
134	160201	Chaku blanca	2	18/08/03	13/01/07				24102	175201	
135	9102	Q´ara intermedia café	0						15198	70105	
136	132202	Chaku pivol	2	24/03/05	18/02/07				03--99	02--99	
137	166302	Q´ara intermedia pivol	2	10/02/05	20/01/07				770200	210203	
149	1350300	Q´ara café	5	15/03/02	09/03/03	12/01/05	12/02/06	10/02/07	No determinado		
170	40101	Q´ara blanca	4	30/01/04	29/01/05	27/01/06	27/01/07		175201	24102	
171	800200	Chaku café rojizo	3	18/01/03	24/02/04	24/03/07			770200	03--99	
172	37298	No tipificada	4	21/02/01	28/01/03	14/01/05	17/02/07		15198	70105	
187	450199	Chaku pivol	2	15/02/06	19/03/07				24102		
190	37103	Chaku blanca	2	20/01/06	18/03/07				899	770200	
191	1790300	No tipificada	3	24/01/03	2/2/2004	24/02/06			24102	02--99	
193	550199	Q´ara blanca	1	19/02/02					210203	70105	
196	38101	Q´ara pivol	2	27/01/05	28/02/06				24102	03--99	03--09
197	78202	Q´ara pivol	1	31/01/05					02--99	210203	
198	1290299	Q´ara blanca	2	23/02/05	24/02/06				175201	70105	

199	110202	Chaku blanca	2	19/01/05	06/02/07				770200	15198	
196-1	34101	No tipificada	1	4/2/2008					175201	210203	
197-1	1990600	Q'ara blanca negra	3	19/01/03	27/02/04	10/01/07			24102	02--99	02--99
185	690200	No tipificada	4	4/2/2000	29/03/04	15/04/06	9/4/2007		175201		

* Donadora / Receptora: Antecedentes reproductivos si fueron utilizadas en el 2007.

ANEXO 01. Antecedentes reproductivos de hembras receptoras

Nº Receptora	Nº arete	Características	Nº partos anteriores	Fechas de partos			
Grupo Control							
100	107205	Q´ara café	1	27/01/08			
101	29102	Q´ara pivol	2	25/01/06	02/01/08		
102	34103	Q´ara pivol	3	03/03/05	16/03/06	17/01/08	
104	510199	Chaku blanca negra	4	11/01/03	3/2/2004	05/02/05	08/02/06
105	244303	Chaku gris	2	24/01/06	23/12/07		
107	175203	Q´ara intermedia negra	2	15/03/06	23/03/08		
108	2102	Chaku pivol	1	16/02/07			
142	96103	Q´ara blanca	2	28/01/07	17/02/08		
143	4103	Chaku pivol	1	15/02/08			
144	150203	Chaku pivol	1	13/01/06			
145	180203	Q´ara intermedio pivol	3	14/02/06	16/02/07	15/02/08	
146	17102	Chaku negra	1	14/02/05			
147	171203	Q´ara café claro	1	17/02/05			
Grupo Vitrificado							
10	84201	Q´ara intermedia café	2	2/3/2005	16/01/06		
47	52298	Q´ara café claro	3	10/03/02	19/02/06	12/02/07	
48	249303	Q´ara café blanco	2	5/2/2006	11/02/08		
49	75202	Q´ara blanca	1	13/02/08			
51	870299	Chaku blanco manchado	3	11/02/03	22/01/05	15/02/08	
59	60101	Q´ara blanca	2	21/01/05	17/01/07		
62	58101	Q´ara api	2	22/02/04	10/02/06		
72	106103	Chaku pivol	2	30/01/07	24/02/08		
123	89201	Chaku café claro	1	24/02/07			
154	1252	Chaku café claro	2	21/03/	18/02/		

	02			05	07		
155	3101 00	Chaku blanco	2	07/02/ 03	13/02/ 06		
163	8402 99	Q´ara café	4	08/04/ 01	04/02/ 03	06/02/ 05	04/02/0 6
Grupo Congelación							
23	5901 99	Q´ara café	2	07/02/ 03	07/03/ 07		
30	6199	Chaku blanco	4	30/01/ 03	30/01/ 05	09/02/ 06	23/02/0 7
68	1603 02	Chaku blanco	1	09/02/ 06			
116	2523 03	No tipificada	1	22/01/ 08			
118	1322 01	Q´ara blanca manchada	2	08/02/ 04	24/02/ 06		
119	1892 01	Chaku café claro	2	03/03/ 05	06/02/ 06		
148	1919 9	Chaku blanco	3	20/03/ 02	31/01/ 04	08/02/ 05	
169	1702 03	Q´ara blanco manchado	3	14/02/ 06	02/03/ 07	05/03/ 08	
172	5401 99	Q´ara café	3	23/01/ 03	05/02/ 04	06/03/ 07	
175	1510 2	Chaku café manchado	2	13/02/ 07	20/02/ 08		
176	4701 00	Chaku café manchado	2	22/02/ 05	08/02/ 08		

* Donadora / Receptora: Antecedentes reproductivos si fueron utilizadas en el 2007.

ANEXO 02. Número de servicios realizados por los machos reproductores

Nº aret	Característic as	Nº servici	Fechas de servicios
------------	---------------------	---------------	---------------------

e		os						
1752 01	Q café manchado	7	15/02/20 08	20/02/20 08	27/02/20 08	28/02/20 08	10/03/2 008	13/03/2 008
1519 8	Q´ara blanco	5	15/02/20 08	20/02/20 08	10/03/20 08	13/03/20 08	17/03/2 008	
2410 2	Q´ara pivol	6	20/02/20 08	02/02/20 08	27/02/20 08	28/02/20 08	13/03/2 008	17/03/2 008
03-- 99	Q´ara blanco	3	20/02/20 08	13/03/20 08	17/03/20 08			
02-- 99	Q´ara blanco	5	20/02/20 08	25/02/20 08	28/08/20 08	10/03/20 08	13/03/2 008	
2102 03	Q´ara negro	5	20/02/20 08	25/02/20 08	28/02/20 08	10/03/20 08	13/03/2 008	
7010 5	Q´ara blanco	5	20/02/20 08	25/02/20 08	10/03/20 08	13/03/20 08	17/03/2 008	
7702 00	Q´ara gris	5	20/02/20 08	25/02/20 08	10/03/20 08	13/03/20 08	17/03/2 008	
899	Q´ara blanco	1	25/02/20 08					

ANEXO 03. Características y distribución de embriones de los grupos experimentales

N° Donador a	N° Embrión	Estadio de embrión recuperado	Cuerno recuperado	Calidad de embrión		Prueba	Evaluación de transferencia		
				Antes	Después		Transferencia	Cuerno	Diámetro CL
107	1	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	2	Congelado	In vivo (118)	Derecho	9 mm
	2	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	2	Vitrificado	In vivo (47)+	Derecho	11 mm
	3	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Congelado	In vivo (119)	Izquierdo	9 mm
	4	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vivo (175)	Izquierdo	10 mm
	5	Blastocisto eclosionado	Derecho	1		Congelado	NP		
	6	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Vitrificado	In vitro		
	7	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (48)	Derecho	8 mm
149	9	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	3	Vitrificado	In vitro		
	NR	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	3		NP	NP		
197	9	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1		Congelado	In vitro		
	NR	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	3		NP	NP		
	10	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Vitrificado	In vivo (163)	Izquierdo	10 mm
198	11	Blastocisto eclosionado	Derecho	1		Congelado	NP		

	12	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (155)	Derecho	9 mm
199	13	Blastocisto	Izquierdo	1	1	Congelado	In vivo (68)	Derecho	10 mm
	NR	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	3		NP	NP		
	14	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	1	Vitrificado	In vitro		
	15	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vitro		
	16	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Vitrificado	In vivo (51) +	Derecho	11 mm
	17	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Congelado	In vivo (176)	Derecho	11 mm

N° Donador a	N° Embrión	Estadio de embrión recuperado	Cuerno recuperado	Calidad de embrión		Prueba	Evaluación de transferencia		
				Antes	Después		Transferencia	Cuerno	Diámetro CL
196	18	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Vitrificado	In vivo (49)	Derecho	10 mm
	NR	Mórula > 16 células	Derecho	1		NP	NP	NP	NP
	NR	Mórula compacta	Izquierdo	1		NP	NP	NP	NP
	NR	Mórula compacta	Izquierdo	1		NP	NP	NP	NP
	NR	Mórula > 16 células	Izquierdo	1		NP	NP	NP	NP
193	19	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	2	Congelado	In vitro		
	20	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	3	Vitrificado	In vitro		
	NR	Mórula compacta	Izquierdo	1		NP	NP	NP	NP
191	NR	Mórula compacta	Izquierdo	1		NP	NP	NP	NP

	21	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vivo (169)	Izquierdo	11 mm
	NR	Mórula compacta	Derecho	2		NP	NP	NP	NP
	NR	Mórula compacta	Derecho	2		NP	NP	NP	NP
	NR	Mórula > 16 células	Derecho	1		NP	NP	NP	NP
190	22	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (123)	Izquierdo	10 mm
	23	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In Vitro		
130	NR	Mórula compacta	Izquierdo	2		NP	NP	NP	NP
	28	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (154)	Izquierdo	12 mm
	30	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Vitrificado	In vivo (72)	Derecho	9 mm
	31	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	2	Congelado	In Vitro		
	32	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	2	Vitrificado	In vivo (10)	Derecho	11 mm
	33	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	1	Congelado	In Vitro		

N° Donadora	N° Embrión	Estadio de embrión recuperado	Cuerno recuperado	Calidad de embrión		Prueba	Evaluación de transferencia		
				Antes	Después		Transferencia	Cuerno	Diámetro CL
132	34	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	1	Vitrificado	In vivo (62)	Izquierdo	9 mm
	35	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vivo (116)	Izquierdo	9 mm
	36	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Vitrificado	In vivo (10)	Derecho	11 mm

	37	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vivo (172)	Derecho	9 mm
	38	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	3	Vitrificado	In Vitro		
133	39	Blastocisto eclosionado	Derecho	1		Congelado	In vitro		
	40	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Vitrificado	In vivo (59)	Izquierdo	9 mm
	41	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Congelado	In Vitro		
	42	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Vitrificado	In Vitro		
	43	Blastocisto eclosionado	Derecho	1		Congelado	NP	NP	NP
	44	Blastocisto eclosionado	Derecho	1		Vitrificado	NP	NP	NP
	45	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In Vitro		
	NR	Mórula compacta	Derecho	1		NP	NP	NP	NP
	46	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (59)	Izquierdo	9 mm
	47	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	2	Congelado	In vivo (148)	Izquierdo	8 mm
134	50	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Vitrificado	In vivo (72)	Derecho	9 mm
	51	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	3	Congelado	In Vitro		
	52	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	3	Vitrificado	In Vitro		
	53	Blastocisto eclosionado	Derecho	2		Congelado	NP	NP	NP
	54	Blastocisto	Derecho	2	2	Vitrificado	In vivo (154)	Izquierdo	12 mm

		eclosionado							
	55	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	2	Congelado	In Vitro		

N° Donador a	N° Embrión	Estadio de embrión recuperado	Cuerno recuperado	Calidad de embrión		Prueba	Evaluación de transferencia		
				Antes	Después		Transferencia	Cuerno	Diámetro CL
135	56	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	3	Vitrificado	In vitro		
136	57	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	2	Congelado	In vivo (30)	Derecho	11 mm
137	48	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In Vitro		
	49	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Congelado	In vivo (23)	Derecho	9 mm
172	58	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In Vitro		
	59	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	3	Congelado	In Vitro		
	60	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	2	Vitrificado	In Vitro		
	61	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	2	3	Congelado	In Vitro		
170	62	Blastocisto eclosionado	Derecho	1	1	Vitrificado	In Vitro		
171	63	Blastocisto eclosionado	Izquierdo	1	2	Congelado	In Vitro		
	64	Blastocisto eclosionado	Derecho	2	2	Vitrificado	In Vitro		

ANEXO 03. Características de embriones y hembras donadoras del control

N° Donador a	N° Embrión	Estadio de embrión recuperado	Cuerno	Calidad de embrión		Receptora	Evaluación de transferencia				
				Calidad	Diámetro		Cuerno	Diámetro CL	Hora Lavado	Hora Transfe.	Dx.
187	1C	Blastocisto	Izquierdo	1	400	100	Derecho	10 mm	8:00 pm	10:28 pm	+
450199	2C	Blastocisto	Izquierdo	1	320	101	Derecho	11 mm	8:15 pm	10:36 pm	-
	3C	Blastocisto	Derecho	1	340	102	Izquierdo	11 mm	8:17 pm	10:42 pm	+
	4C	Blastocisto	Derecho	1	280	104	Izquierdo	11 mm	8:18 pm	10:51 pm	-
	5C	Blastocisto	Derecho	2	260	107	Derecho	8 mm	8:20 pm	11:04 pm	-
	6C	Blastocisto	Derecho	2	300	108	Derecho	12 mm	8:22 pm	11:13 pm	+
	7C	Blastocisto	Derecho	1	460	108	Derecho	12 mm	8:22 pm	11:13 pm	
185	8C	Blastocisto	Derecho	1	180	105	Derecho	10 mm	7:45 pm	11:00 pm	+
196	9C	Blastocisto	Derecho	1	380	143	Derecho	9 mm	5:10 pm	6:50 pm	-
	NR	Blastocisto	Derecho	1	200	NT	Embrión 26 fue vitrificado				
	NR	Mórula compacta	Derecho	3	140	NT	NT	NT	NT	NT	NT

197	10C	Blastocisto	Derecho	1	380	142	Derecho	9 mm	4:35 pm	6:38 pm	-
	11C	Blastocisto	Derecho	1	400	144	Izquierdo	9 mm	4:50 pm	6:53 pm	-
	12C	Blastocisto	Derecho	1	380	145	Derecho	9 mm	4:55 pm	7:02 pm	-
	13C	Blastocisto	Derecho	1	360	146	Izquierdo	9 mm	4:57 pm	7:08 pm	-
	14C	Blastocisto	Derecho	1	320	147	Derecho	12 mm	5:00 pm	7:10 pm	-
	NR	Blastocisto	Derecho	1	NR	NT	Embrión 25 fue congelado				
	NR	Blastocisto	Derecho	1	NR	NT	Embrión 27 fue congelado				
	NR	Blastocisto	Derecho	1	NR	NT	Embrión 29 fue congelado				
	NR	Blastocisto	Derecho	1	NR	NT	Embrión 24 fue vitrificado				

